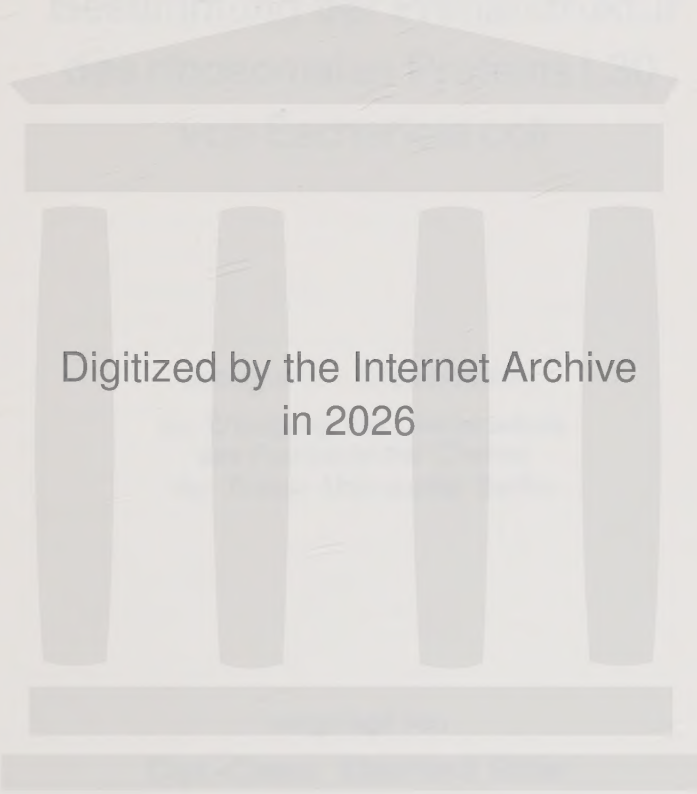


Bestimmung der Primärstruktur
des ribosomalen Proteins L30
von Eschericia coli

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Eberhard Ritter
aus Strümpfelbach

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Bestimmung der Primärstruktur
des ribosomalen Proteins L30
von Eschericia coli**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Eberhard Ritter
aus Strümpfelbach**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Wittmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Koßmehl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.1.1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I Einleitung	1
II Material und Methoden	3
A. Proteinisolierung	
1) Bakterienzüchtung	3
2) Isolierung der 50S-Untereinheit	3
3) Vorfraktionierung der Proteine	4
4) Ausfällung der RNS	4
5) Trennung der Proteine	5
7) Nachweis der Proteine	6
8) Reinheitskontrolle	6
B. Primärstrukturaufklärung	7
1) Aminosäurezusammensetzung	7
2) Spaltungen	8
3) Trennung der Peptide	12
4) Sequenzierung	18
III Ergebnisse	26
1) Proteinisolierung	26
2) Aminosäurezusammensetzung	28
3) Trennung der tryptischen Peptide	30
4) Peptidkarte der tryptischen Peptide	35
5) Sequenzierung	40
6) Reihenfolge der tryptischen Peptide	44
7) Gesamtsequenz	54
8) Überlegungen zur Sekundärstruktur	55
IV Diskussion	59
V Zusammenfassung	62
VI Literaturverzeichnis	63

I EINLEITUNG

Das Ribosom ist ein Zellteilchen mit sehr komplexer Funktion. Es ist der Ort, an dem entsprechend der Information der Messenger-RNS die Proteine synthetisiert werden. Das Ribosom ist das Zellorgan, das letztlich den in der DNS, dem Erbträger, gespeicherten Bauplan umsetzt in die Funktionseinheiten einer Zelle, die Proteine. Da dies ein ganz zentraler Punkt des Zellgeschehens ist, wird die Aufklärung der Struktur und Funktionsweise des Ribosoms mit großer Intensität betrieben (zur Übersicht s. ¹⁾).

Am besten untersucht sind die Ribosomen des Bakteriums *Escherichia coli*. Sie können in zwei Untereinheiten zerlegt werden, die in der Ultrazentrifuge mit der Sedimentationskonstanten 30S bzw 50S sedimentieren. Die 30S-Untereinheit besteht aus einer 16S-Ribonukleinsäure und 21 Proteinen, die 50S-Untereinheit enthält zwei Ribonukleinsäuren von 5S bzw 23S und 34 Proteine. Beide Untereinheiten können in vitro in die einzelnen Bestandteile zerlegt werden und zu den funktionell aktiven Partikeln rekonstituiert werden ²⁾³⁾

Von einzelnen Proteinen sind bestimmte Funktionen bekannt. Man weiß auch manches über die Gestalt der Untereinheiten und über die Anordnung einzelner Proteine (Übersichten in ¹⁾) Aber bei einem so komplizierten Gebilde ist eine vollständige Aufklärung des Zusammenspiels der einzelnen Bestandteile nicht zu erwarten, bevor nicht die Bestandteile selbst genau bekannt sind. Daher ist es wichtig, die Ribonukleinsäuren und die Proteine möglichst vollständig zu charakterisieren, und das heißt vor allem, ihre Primärstruktur aufzuklären.

Das Protein L30 ist eines der kleineren Proteine der 50S-Untereinheit des *E. coli* Ribosoms. Es hat einen isoelektrischen Punkt von über 12, ist also stark basisch ⁴⁾. Über seine Rolle in den komplizierten Funktionsabläufen des Ribosoms ist nicht viel bekannt. Durch Affinitäts-

markierung wurde gezeigt, daß es in der nativen 50S-Untereinheit neben dem GTP-ase Zentrum liegt⁵⁾. Auch wurde ein Komplex aus 5S-RNS und mehreren Proteinen isoliert, der in geringen Mengen auch L30 enthält⁶⁾. Dieser Komplex besitzt GTP-ase Aktivität. Es wurde aber nachgewiesen, daß L30 nicht direkt und spezifisch an die RNS bindet⁷⁾. Ferner zeigte sich, daß die Entfernung von L30 aus der 50S-Untereinheit die enzymatische Hydrolyse von GTP nicht stört⁸⁾. Durch immunologische Studien wurde bestätigt, daß es an der GTP-ase Aktivität nicht direkt beteiligt ist⁹⁾. Eine spezifische Funktion dieses Proteins wurde bei den bisher durchgeführten Untersuchungen nicht gefunden.

Die Aufklärung der Aminosäuresequenz des Proteins L30 ist ein Weg, um weitere Einsichten in die Rolle dieses Proteins innerhalb des komplizierten Zusammenspiels zu gewinnen. Denn einerseits ist in der Primärstruktur die gesamte Information eines Proteins enthalten, das heißt sein gesamtes Verhalten ist dadurch bestimmt. Dies eröffnet prinzipiell die Möglichkeit, Eigenschaften eines Proteins vorherzusagen. Bei dem heutigen Wissenstand können bei bekannter Primärstruktur bereits fundierte Überlegungen zur Sekundärstruktur angestellt werden. Zum andern ermöglicht die Kenntnis der Aminosäuresequenz weitergehende Untersuchungen, zum Beispiel durch gezielte Modifikation oder durch Lokalisierung bestimmter Phänomene, wie der Wechselwirkung mit anderen Molekülen, in einem bestimmten Sequenzbereich. Auch die Aufklärung von eventuell auftretenden Mutanten setzt die Kenntnis der Primärstruktur des Wildtypproteins voraus.

Diese Arbeit bringt daher die Ermittlung der Aminosäuresequenz des Proteins L30 und Überlegungen zur Sekundärstruktur.

II MATERIAL UND METHODEN

A. Proteinisolierung

1) Bakterienzüchtung

In einem 50l Fermenter (Fa. Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz) wurden E.coli Bakterien vom Stamm N477 gezüchtet. Das Medium enthielt pro Liter 5g Hefeextrakt, 10g Bacto-Trypton und 5g NaCl. Beim Animpfen wurde pro Liter noch 10ml 20 %-ige Glukoselösung zugegeben, die getrennt sterilisiert worden war. Es wurde mit ca 2 Liter Vorkultur, die über Nacht im gleichen Medium gewachsen war, angeimpft. Wachstumstemperatur war 37°. Der pH-Wert wurde mit 4n NaOH zwischen 6,8 und 7,5 gehalten.

Das Bakterienwachstum wurde durch Messen der Extinktion bei 650nm verfolgt. In der logarithmischen Phase bei einer optischen Dichte von etwa 2,5 wurde durch Zentrifugation in einer Durchflußzentrifuge geerntet. Eine Züchtung ergab ungefähr 250g Bakterien, die entweder sofort weiterverarbeitet wurden oder eingefroren wurden.

2) Isolierung der 50S-Untereinheit

Etwa 250g Bakterien wurden mit 150ml Puffer (10^{-3}M MgCl_2 , $10^{-2}\text{M KH}_2\text{PO}_4$, $10^{-2}\text{M Mercaptoäthanol}$, pH 7,4) und 0,1mg Desoxyribonuklease im Mixer homogenisiert¹⁰⁾. Die Suspension wurde durch eine Bakterienpresse gegeben und anschließend die großen Zellbruchstücke abzentrifugiert (16 000 Upm, 40 min). Der Überstand, der die dissoziierten Ribosomen-untereinheiten enthielt, wurde direkt auf vier Zonalrotoren aufgegeben, wo durch Zentrifugation in einem Zuckergradienten die Untereinheiten getrennt wurden.

Die die 50S-Untereinheit enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und durch Zugabe von 10 % Polyäthylenglykol 6000 bei 4° die Untereinheiten ausgefällt¹¹⁾. Nach einer Stunde Rühren wurde der Niederschlag abzentrifugiert (10 000 Upm,

20 min). Die Ausbeute betrug etwa 3g 50S-Untereinheiten.

3) Vorfraktionierung der Proteine

Durch Behandlung mit Puffern verschiedener LiCl-Konzentrationen können die Proteine der 50S-Untereinheit vorfraktioniert werden, da jeweils nur bestimmte Proteine von der Untereinheit abdissoziieren¹²⁾. Diese Vorfraktionierung ist notwendig, weil eine Trennung aller 34 Proteine anders kaum möglich ist.

Der Niederschlag der Polyäthylenglykolfällung wurde suspendiert in 10mM Tris/HCl pH 7,8, 10mM MgCl₂, 0,1mM EDTA und auf eine Konzentration von etwa 20mg/ml gebracht. Bei 4° wurde dreimal 4 Stunden gegen diesen Puffer dialysiert. Danach wurde im Verhältnis 1:1 verdünnt mit 10mM MgCl₂, 5M LiCl und 8 Stunden im Eisbad gerührt. Dann wurde mit Polyäthylenglykol wie oben beschrieben gefällt und zentrifugiert. Der Überstand (UI) enthält die vom Ribosom abgelösten Proteine, der Niederschlag die Restuntereinheiten. L30 wird bei dieser Salzkonzentration noch nicht abgewaschen und befindet sich daher in Niederschlag.

Zur weiteren Fraktionierung wurde der Niederschlag aufgenommen in einem Puffer aus 50mM Tris/HCl pH 7,8, 0,1M MgCl₂, in derselben Menge wie oben. Dann wurde wieder bei 4° dreimal 4 Stunden gegen diesen Puffer dialysiert und anschließend 1:1 verdünnt mit 7M LiCl, 0,1M MgCl₂ und 8 Stunden im Eisbad gerührt. Es folgte eine Polyäthylenglykolfällung und Zentrifugation wie beim obigen Arbeitsgang.

L30 befand sich nun zum größeren Teil im Überstand (UII) ein kleinerer Teil blieb im Niederschlag. UII enthielt außer dem Proteingemisch noch RNS-Bestandteile. Der Niederschlag wurde von mir nicht weiterverarbeitet.

4) Ausfällung der RNS

Aus dem Überstand UII wurde zunächst das Protein-RNS Gemisch ausgefällt, indem bei 0°C ein Volumenteil Alkohol

und 4,5 Volumenteile Aceton zugegeben wurden und 30 min gerührt wurde. Dann wurde abzentrifugiert (10 000 Upm, 30 min). Der Niederschlag wurde aufgenommen in einer 0,2M Mg-Acetatlösung (in etwa 100ml bei 3g Ausgangsmaterial). Bei 0°C wurden dazu zwei Volumenteile Essigsäure gegeben und 30 min gerührt. Die ausgefallene RNS wurde bei 10 000 Upm abzentrifugiert. Mit dem Niederschlag wurde dieselbe Fällung noch einmal durchgeführt und beide Überstände vereinigt. Diese wurden anschließend über Sephadex G25 in 5 % Essigsäure entsalzt. 250g Bakterien ergaben etwa 0,4g Proteingemisch.

5) Trennung der Proteine

a) Trennung über CM-Zellulose

Carboxymethylzellulose (Whatman CM32, mikrogranular) wurde entsprechend der Anweisung des Herstellers vorbehandelt und eine Säule der Dimension 45 x 2 cm damit gepackt. Äquilibriert wurde mit dem Startpuffer des sich anschließenden Gradienten. In demselben Puffer wurde das Proteingemisch aufgetragen, und zwar etwa 1g Protein auf eine Säule. Es wurde mit einem linearen Gradienten aus je 3,5l der folgenden Puffer eluiert¹²⁾:

Puffer 1: 6M Harnstoff

0,01M Pyridin/Ameisensäure pH 3,4

0,1 % Mercaptoäthanol

Puffer 2: 6M Harnstoff

0,6M Pyridin/Ameisensäure pH 5,0

0,1 % Mercaptoäthanol

Die Durchflußgeschwindigkeit wurde auf etwa 60 ml/h eingestellt. Es wurden Fraktionen von ca. 10 ml aufgefangen.

b) Trennung mit Sephadex G100

Das Trennvermögen der CM-Zellulosesäule reichte nicht aus, um L30 von allen anderen Proteinen abzutrennen. Daher war eine Nachtrennung erforderlich, wofür Sephadex G100 gewählt wurde.

Die das Protein L30 enthaltenden Fraktionen der CM-Zellulosesäule wurden gesammelt, über Sephadex G25 ent-

salzt und lyophilisiert. Das Proteingemisch wurde in 15 ml 15 %-iger Essigsäure wieder gelöst und auf eine Säule 3 x 250 cm, gefüllt mit Sephadex G100 in 15 % Essigsäure, aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 25 ml/h bei einem hydrostatischen Druck von 1m. Es wurden Fraktionen mit 7 ml aufgefangen.

7) Nachweis der Proteine

Zum Nachweis der Proteine wurde die Polyacrylamidgелеlektrophorese herangezogen¹³⁾. Es wurde von jeder Fraktion ein Aliquot abgenommen (bei der Ionenaustauschersäule 0,7 ml, bei der Sephadextrennung 0,5 ml). Bei der Sephadexsäule konnte dies gleich getrocknet werden, bei der CM-Zellulosesäule mußte zur Entfernung des Harnstoffs zuerst gegen Wasser dialysiert werden. Die Proben wurden in 2,5 % Acrylamid, 8 M Harnstoff aufgenommen und auf ein 15 %-iges Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V während 4 Stunden. Nach dem Anfärben mit Amidoschwarz und dem Entfärben in fließendem Wasser waren die Proteine als scharfe Banden sichtbar.

8) Reinheitskontrolle

Um die Identität der Proteine und ihren Reinheitsgrad festzustellen, wurde die zweidimensionale Polyacrylamidgелеlektrophorese angewendet¹⁴⁾. Bevor das Material zu Sequenzstudien benutzt wurde, wurde zusätzlich mit Hilfe einer Peptidkarte der tryptischen Peptide (s.u.) die Reinheit kontrolliert.

B. Primärstrukturaufklärung

Im N-terminalen Bereich des Proteins konnte die Aminosäuresequenz mit Hilfe des automatisierten Edmanabbaus aufgeklärt werden. Um im übrigen Bereich die Primärstruktur zu erhalten, wurden die tryptischen Peptide isoliert und sequenziert. Dann mußte durch die Charakterisierung anderer, überlappender Spaltprodukte die Reihenfolge der tryptischen Peptide festgestellt werden.

1) Aminosäurezusammensetzung des Proteins

a) Totalhydrolyse

2 - 5 nMol Protein wurden in ein spezialgereinigtes Reagenzglas gebracht. Dazu wurden 0,2 ml 5,7 n HCl mit 0,02 % Mercaptoäthanol (zum Schutz von Methionin gegen Oxydation durch Sauerstoff) gegeben. Nachdem ausgiebig mit Stickstoff gespült worden war, wurde unter Wasserstrahlvakuum abgeschmolzen und während 20 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Danach wurde im Exsikkator über NaOH getrocknet und die Probe auf den Aminosäureanalysator gegeben. Bei der Analyse von Peptiden wurde gleich verfahren.

b) Test auf Tryptophan

Da Tryptophan bei der eben beschriebenen, normalen sauren Hydrolyse vollständig zerstört wird, mußte ein spezieller Test für Tryptophan durchgeführt werden. Dazu wurde das Protein mit 0,1 ml einer 4-molaren Methansulfonsäurelösung, die 0,2 % Tryptamin enthielt, hydrolysiert¹⁵⁾, in analoger Weise wie bei der Hydrolyse mit Salzsäure. Unter diesen Bedingungen bleibt Tryptophan unzerstört. Das Hydrolysat wurde mit dem Auftragspuffer des Aminosäureanalysators verdünnt und analysiert (auf dem LKB 3201). Um den Tryptophanpeak zu sehen, mußte die Elutionszeit des dritten Puffers verlängert werden. Zur Kontrolle wurden mehrere, Tryptophan enthaltende Testanalysen hergestellt.

c) Test auf Cystein

Cystein wird von dem Aminosäureanalysator als Dimeres eluiert und ergibt so einen Gipfel vor Valin, der aber normalerweise breit und flach und nicht immer eindeutig erkennbar ist. Darum wurde ein spezieller Test durchgeführt.

Cystein kann leicht zu Cysteinsäure oxydiert werden, und diese ist auf dem Aminosäureanalysator leicht erkennbar (vor der Asparaginsäure). Zur Oxydation¹⁶⁾ wird zunächst Perameisensäure hergestellt: 1 ml 30 % H_2O_2 und 9 ml 98 %-ige Ameisensäure werden gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Protein wird in 20 μ l 70 %-iger Ameisensäure gelöst, und im Eisbad werden 0,2 ml der Perameisensäurelösung zugegeben. Nach zwei Stunden wird soweit mit Wasser verdünnt, daß lyophilisiert werden kann. Anschließend wird wie oben beschrieben, nur ohne Zusatz von Mercaptoäthanol, hydrolysiert und auf dem Aminosäureanalysator analysiert.

d) Aminosäureanalysatoren

Die Aminosäureanalysen wurden meist auf einem Beckman Gerät ausgeführt (Beckman Multichrom 4255, Beckman, Palo Alto, USA). Manchmal wurde ein Analysator von LKB benützt (LKB Biocal 3201, LKB München). Die Analysen der von Peptidkarten eluierten Peptide wurden auf dem sehr leistungsfähigen Gerät von Durrum ausgeführt (Durrum D-500, Durrum Instrument Corporation, Palo Alto, USA). Alle Geräte arbeiten im Einsäulenverfahren mit stufenweiser Elution mit drei Puffern.

2) Spaltungen des Proteins

a) Trypsin

Es wurde Trypsin der Firma Merck verwendet, das zur Beseitigung von chymotryptischer Nebenaktivität mit 1-Chlor-4-(4-Benzyl-3-Tosylamino-2-Butanon (TPCK) behandelt worden war. Zur Spaltung wurden etwa 15 mg LSC in 10 ml Wasser gelöst und in ein auf 37°C thermostatisiertes

Gefäß gegeben. Mit 0,05 % NH_3 wurde der pH-Wert auf 7,8 eingestellt. Dann wurden 0,15 mg Trypsin zugegeben. Da der pH-Wert während der Spaltung sank, mußte laufend nachtitriert werden. Nach einer Stunde wurden noch einmal 0,15 mg Trypsin zugegeben (Enzym : Substrat-Verhältnis 1:50). Die Lösung wurde ständig unter Stickstoff gehalten. Nach vier Stunden wurde durch Einfrieren die Reaktion abgebrochen und sofort lyophilisiert.

Bei Spaltungen von kleinen Mengen, wie sie für die Dünnschichtpeptidkarten benötigt wurden, wurde das Vorgehen etwas vereinfacht: Etwa 0,2 mg Protein wurden in 0,4 ml Wasser in einem spitzen Reagenzglas gelöst. Mit 0,05 % NH_3 wurde der pH-Wert auf Werte zwischen 7,8 und 8,5 eingestellt. Dann wurden etwa 4 μ g Trypsin zugegeben und im Wasserbad bei 37°C gehalten. Nach 15 und 30 Minuten wurde der pH-Wert nachgestellt, so daß er in dem angegebenen Intervall blieb. Nach vier Stunden wurde abgebrochen und sofort lyophilisiert. Die zunächst klare Proteinlösung wurde teilweise während der Spaltung trüb.

b) Blockierung der Lysine und Spaltung mit Trypsin

Die ϵ -Aminogruppe von Lysin kann einfach und reversibel blockiert werden mit ETPA (exo-cis-Endoxo-Tetrahydro-phthalsäureanhydrid)¹⁷⁾. Dies ist ein Diels-Alder-Produkt von Maleinsäureanhydrid und Furan, das mit Aminen leicht halbseitig ein Amid bildet. Die Derivatisierung des Maleinsäureanhydrids erleichtert die Abspaltung dieser Schutzgruppe, die in saurer Umgebung leicht und schonend durchgeführt werden kann. In basischer Umgebung, wie sie bei der Trypsinspaltung herrscht, ist die Amidbindung zwischen ETPA und Lysin stabil. Wegen der Modifizierung kann Trypsin nur noch nach Argininresten spalten.

ETPA, das entsprechend der Vorschrift von Diels und Alder¹⁸⁾ hergestellt worden war und das durch IR-Spektrum und Schmelzpunkt charakterisiert worden war, wurde mir von Doris Schäfer zur Verfügung gestellt¹⁹⁾.

Zur Blockierung wurden etwa 0,6 mg L30 gelöst in 1,4 ml 0,2 M Na-Borat-Puffer pH 9,0, auf 0°C abgekühlt und, da

ein Überschuß nicht störte, eine Spatelspitze ETPA zugegeben. Es wurde zwei Stunden bei 0°C gerührt. Dann wurde die Lösung sofort über Sephadex G15 entsalzt (Säule 1 x 30 cm, in 0,025 % NH_3 , um den pH-Wert basisch zu halten). Die das Protein enthaltenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer auf etwa 0,4 ml eingengt und dann sofort mit Trypsin behandelt, in gleicher Weise wie das unblockierte Protein.

Nach der Spaltung wurde lyophilisiert, in 0,4 ml 5 %-iger Essigsäure aufgenommen und drei Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dadurch wird die Schutzgruppe quantitativ wieder abgespalten. Dann wurde wieder lyophilisiert und das Peptidgemisch getrennt.

c) Chymotrypsin

Mit Chymotrypsin wurde unter denselben Bedingungen und mit demselben Vorgehen gespalten wie mit Trypsin. Es wurde Chymotrypsin der Firma Merck verwendet, das mit TLCK (N-Tosyl-L-Lysyl-Chloromethan) behandelt worden war. Das Enzym:Substrat-Verhältnis wurde etwa 1:100 gewählt. Da Chymotrypsin viel weniger spezifisch spaltet als Trypsin, wurde, um nicht zu kleine Bruchstücke zu erhalten, die Reaktionszeit auf 30 bis 60 Minuten verkürzt.

d) Thermolysin

Thermolysin ist ein temperaturbeständiges Enzym, daher konnte die Spaltung bei erhöhter Temperatur, und zwar bei 55°C durchgeführt werden. Bei dieser Temperatur sind eventuell als Verunreinigungen vorhandene andere Proteasen nicht mehr aktiv. Das übrige Vorgehen war gleich wie bei Trypsin. Das Enzym:Substrat-Verhältnis betrug 1:100, die Reaktionszeit eine Stunde. Das verwendete Thermolysin stammte von der Firma Serva (stabilisiert mit 40 % Na-Acetat und Ca-Acetat).

e) Staphylococcus-Protease

Dieses extrazelluläre Enzym von *Staphylococcus aureus*

ist hochspezifisch und spaltet unter den entsprechenden Bedingungen nur nach Glutaminsäureresten²⁰⁾. Da es noch bei pH 4 aktiv ist, können selbst leichte Verunreinigungen durch andere Proteasen nicht stören, da diese im sauren Bereich nicht aktiv sind. Das Enzym wurde freundlicherweise von J. Houmard, Montreal, Kanada zur Verfügung gestellt.

Zur Spaltung wurden etwa 0,2 mg L30 gelöst in 0,4 ml Wasser und mit einprozentiger Essigsäure auf pH 4,0 titriert. Dann wurde etwa in einem Verhältnis 1:50 das Enzym zugegeben und 20 Stunden bei 37°C gespalten.

f) Chemische Spaltung mit Bromcyan

Mit BrCN kann auf chemischem Wege sehr spezifisch und mit großer Ausbeute eine Peptidkette nach Methionin gespalten werden²¹⁾.

Das Protein wurde in 70 % Ameisensäure gelöst und ein 100 bis 500-facher molarer überschuß an BrCN zugegeben. Die Spaltung erfolgte während 24 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde verdünnt und lyophilisiert.

3) Trennung der Peptide

Wenn die Spaltungen in präparativem Maßstab durchgeführt wurden, kamen zur Trennung nur Säulentechniken in Frage. Die Peptide aus zwei Trypsinspaltungen und einer Trypsinspaltung nach ETPA-Blockierung wurden so aufgearbeitet. Das Trennvermögen einer Säule reichte dabei nicht aus, um alle Peptide in reiner Form zu erhalten. Deshalb mußten immer mehrere Säulentechniken kombiniert werden.

Bei der Arbeit in analytischem Maßstab stellt die Technik der Dünnschichtpeptidkarte eine ausgezeichnete Methode dar, die sehr schnell und mit sehr gutem Trennvermögen arbeitet, und die es gestattet, die Peptide immerhin in ausreichender Menge zu gewinnen, um damit eine zuverlässige Aminosäureanalyse zu machen, oder sogar um mit Hilfe der Dansyl-Edmanteknik die Sequenz kürzerer Bruchstücke zu bestimmen.

a) Ionenaustauschchromatographie an Sulfoäthylzellulose

Die Sulfoäthylzellulose (SE-Zellulose, Kapazität 0,21, Serva, Heidelberg) wurde folgendermaßen vorbereitet: Zuerst ließ man sie in 10 bis 20-fachem Volumen von 0,5 n NaOH, 0,5 M NaCl während 30 Minuten quellen. Auf einer Fritte wurde abgesaugt und mit 0,5 M NaCl gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats etwa neutral war. Dann wurde in 0,5 n HCl suspendiert, etwa 10 Minuten gerührt, wieder abgesaugt und mit 0,5 M NaCl wieder neutral gewaschen. Zuletzt wurde zweimal mit dem Anfangspuffer gewaschen. Zum Abschleimmen der feinen Teilchen, die die Säule verstopfen würden, ließ man mehrere Male im Anfangspuffer für etwa eine halbe Stunde stehen und dekantierte den Überstand ab. Danach wurde am Wasserstrahlvakuum entlüftet und unter einen Druck von 0,3 atü die Säule gepackt. Es wurde mit zwei verschiedenen Säulen und verschiedenen Gradienten gearbeitet.

α) Große SE-Zellulose-Säule

Zur Trennung der Peptide der ersten tryptischen Spaltung wurde eine 1,5 x 45 cm große Säule verwendet. Sie wurde mit einem nichtlinearen Gradienten eluiert, wobei sowohl die Ionenstärke als auch der pH-Wert zunahm²²⁾.

Zur Herstellung dieses Gradienten diente ein Mischgerät mit 8 linear miteinander verbundenen Gefäßen, die je 150 ml der folgenden Puffer enthielten:

1.	0,01 M Pyridin/Ameisensäure	pH 2,7	Leitfähigkeit 0,98 mS
2.	0,02 M	pH 2,8	1,42 mS
3.	0,03 M	pH 3,0	1,77 mS
4.	0,04 M	pH 3,1	2,18 mS
5.	0,06 M	pH 3,3	2,82 mS
6.	0,08 M	pH 3,5	3,52 mS
7.	0,16 M	pH 4,1	5,88 mS
8.	0,32 M	pH 4,5	8,86 mS

Daran schloß sich ein linearer Gradient aus je 150 ml von Puffer 8 und einem 1,6 M Pyridin/Ameisensäure-Puffer an. Zum Schluß wurde noch mit 0,2 M NaOH eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde etwa auf 27 ml/h eingestellt, die Fraktionsgröße betrug 3 ml. Das Peptidgemisch wurde im ersten Puffer aufgetragen.

β) Kleine SE-Zellulose-Säule

Für kleinere Mengen an Peptiden, vor allem für bereits vorfraktioniertes Material, erwies sich die obige Säule als zu groß. Darum wurde mit einer Säule 0,3 x 30 cm gearbeitet. Diese Säule war mit einem Wassermantel umgeben und die Trennung wurde bei 40°C oder 50°C durchgeführt. Der Anfangspuffer entsprach dem Puffer 1 der großen Säule, und zuerst wurde immer mit 10 ml dieses Puffers eluiert. Dann folgte ein linearer Gradient aus je 25 ml vom Puffer 1 und einem 0,05 M Pyridin/Ameisensäure-Puffer pH 3,4. Daran schloß sich ein zweiter Gradient an, der aus je 15 ml des 0,05 M Puffers und eines 0,2 M Pyridin/Ameisensäure-Puffers pH 4,1 hergestellt wurde. Zur Sicherheit wurde anschließend noch mit 10 ml 33 % Pyridin eluiert. Es wurden Frak-

tionen zu je 1 ml aufzufangen, bei einer Durchflußgeschwindigkeit von etwa 5 ml/h.

b) Ionenaustauschchromatographie an Dowex M71

Das Trennvermögen des Dowex-Harztes ist größer als das der SE-Zellulose. Auf der anderen Seite werden die Peptide auch stärker zurückgehalten, und bei größeren, basischen Peptiden stand zu befürchten, daß sie im Eluat nicht wieder gefunden würden. Daher wurde nur zur Trennung der sauren und neutralen Peptide, die über die SE-Zellulosesäule vorfraktioniert worden waren, sowie zur Trennung der tryptischen Peptide nach der ETPA-Blockierung, wo auf die basischen Peptide kein Wert gelegt wurde, eine Dowex-Säule verwendet.

Es wurde mit einer sehr kleinen Säule (0,2 x 5 cm) mit Wassermantel gearbeitet²³⁾. Trennmateriale war Dowex M71 der Firma Beckman. Die Säule wurde auf 50°C erwärmt und wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/h betrieben. Es wurden Fraktionen von 0,8 ml bis 1 ml gesammelt. Zur Elution wurden folgende Puffer verwendet:

1. 0,1 M Pyridin/Essigsäure pH 3,0
2. 0,2 M pH 3,5
3. 1,0 M pH 4,4

Daraus wurden je nach den Erfordernissen des Trennproblems lineare Gradienten hergestellt. Regeneriert wurde die Säule mit 33 % Pyridin. Die Probe wurde im 1. Puffer aufgetragen.

c) Zellulose-Säule

Zur weiteren Trennung der basischen Peptide, die über die große SE-Zellulosesäule bereits vorfraktioniert waren, wurde eine mit Zellulose gefüllte Säule verwendet. (Zellulosepulver MN 2100, Macherey, Nagel + Co, Düren). Die Zellulose wurde vor dem Packen der Säule mehrere Male gewaschen (mit 0,1 n HCl, dann 20 % Pyridin, zuletzt mit dem Elutionsmittel PBEW). Dann wurde sie im Elutionsmittel aufgenommen, in Wasserstrahlvakuum entlüftet und

eine Säule der Dimension 0,3 x 60 cm damit gefüllt. Als Elutionsmittel diente das auch für die Papier- und Dünnschichtchromatographie verwendete PBEW-System (50 ml Pyridin, 75 ml n-Butanol, 15 ml Essigsäure, 60 ml Wasser). In dieser Mischung wurde auch die Probe aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Es wurden Fraktionen von je 0,3 ml gesammelt. Die Fließgeschwindigkeit wurde mit Hilfe des hydrostatischen Drucks auf etwa 1,5 ml/h reguliert.

d) Trennung über Sephadex

In zwei Fällen wurde zur Peptidtrennung Sephadex G15 verwendet. Dazu diente eine 1 x 200 cm große Säule mit Sephadex G15 in 20 % Essigsäure. Das Peptidgemisch wurde ebenfalls in 20 % Essigsäure aufgenommen und so aufgetragen. Es wurde mit einer Geschwindigkeit von etwa 5 ml/h eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml.

e) Nachweis der Peptide

Der Nachweis der Peptide erfolgte mittels Papier- oder Dünnschichtchromatographie. Das bot den Vorteil, daß damit auch zwischen reinen Fraktionen und Peptidgemische enthaltenden Fraktionen unterschieden werden konnte. In Bereichen, in denen kein Peptid sichtbar war, wurden Sammelfraktionen hergestellt und durch Totalhydrolyse kontrolliert, ob sie wirklich peptidfrei waren.

Bei der Trennung mit der großen SE-Zellulosesäule wurde auf großen Papierbögen absteigend chromatographiert, bei den anderen Trennungen wurden wegen dem geringeren Materialverbrauch und der schnelleren Durchführbarkeit kleine Papierbögen oder Dünnschichtplatten in aufsteigender Chromatographie verwendet.

Bei Verwendung der großen Papierbögen wurde von jeder vierten Fraktion 0,5 ml abgenommen, im Exsikkator getrocknet, in 50 x 50 % Pyridin wieder aufgenommen und auf Chromatographiepapier (Schleicher-Schüll 2045a) getüpfelt. Die Auftrennung erfolgte in absteigender Chroma-

tographie. Laufmittel war das PBEW-System. Die getrockneten Bögen wurden mit einem Ninhydrinreagenz besprüht (3 g Ninhydrin, 30 ml Collidin, 100 ml Essigsäure, 870 ml Äthanol) und für etwa zehn Minuten auf 60°C erwärmt. Danach waren die Peptide als blaue oder graue bis gelbe Flecken sichtbar.

Bei den Trennungen mit kleineren Säulen konnte direkt ein Aliquot jeder zweiten oder dritten Fraktion für die Chromatographie getupfelt werden. Meist reichten 10 oder 20 λ aus. Es wurde entweder auf Papier aufgetragen (Schleicher-Schüll 2043a), das in 20 x 20 cm große Stücke geschnitten worden war, oder auf Zellulose-Dünnschichtplatten (Polygram Cel 300, 20 x 20 cm, Macherey, Nagel + Co). Es wurde ebenfalls im PBEW-System entwickelt, aber nach der aufsteigenden Methode. Um die Flecken sichtbar zu machen, wurde mit dem oben beschriebenen Ninhydrinreagenz besprüht und eine Minute auf 110°C erhitzt.

f) Peptidkarten-Technik (Fingerprint)

Bei den Peptidkarten oder Fingerprints wird das Peptidgemisch in zwei Dimensionen aufgetrennt. In der ersten Dimension wird eine elektrophoretische Trennung durchgeführt, die zweite Dimension besteht aus einer Chromatographie. Früher wurden diese Peptidkarten auf großen Papierbögen ausgeführt, wobei die Chromatographie wie bei dem Peptidnachweis absteigend erfolgen mußte. Aber die Verwendung von Zellulose-Dünnschichtplatten erwies sich als überlegen. Die Durchführung ist damit schneller und einfacher möglich, man braucht weniger Material und die Trennschärfe ist höher. Darum wurden von mir ausschließlich Dünnschichtplatten verwendet (Polygram Cel 300, 20 x 20 cm, Macherey, Nagel + Co).

Zum Auftragen wird üblicherweise das Peptidgemisch in 5 % Essigsäure gelöst. In einigen Fällen waren jedoch bei mir die Peptidgemische darin nicht löslich. Deshalb wurde generell das lyophilisierte Material in 5 λ reiner Ameisensäure aufgenommen, dann sofort unter starkem

Schütteln mit 5 oder 10 μ l Wasser verdünnt und so aufgetragen. So blieb in den meisten Fällen kein unlöslicher Rückstand zurück, und die Peptidkarten waren ziemlich gut reproduzierbar.

Vor dem Auftragen wurde die Dünnschichtplatte gleichmäßig mit dem Elektrophoresepuffer besprüht (40 ml Pyridin, 80 ml Essigsäure, 300 ml Aceton, 1580 ml Wasser, pH 4,4) und 20 Minuten ohne Peptide der Elektrophorese unterzogen. Dadurch wird eine völlig gleichmäßige Befeuchtung der Platte erreicht. Dann wurde bei abgeschalteter Spannung in einer Ecke das Peptidgemisch aufgetragen und anschließend die Elektrophorese ausgeführt (2 h, 400 V, ca 15 mA). Nach dem Trocknen erfolgte in der zweiten Dimension die chromatographische Auftrennung im PBW-System.

Die Peptidflecken wurden wieder mit Hilfe der Ninhydrinreaktion sichtbar gemacht. Ninhydrin reagiert mit den vorhandenen Aminogruppen, d.h. mit der Seitenkette von Lysin und mit der N-terminalen Aminosäure. Dabei wird der Stickstoff abgespalten und die entsprechende Aminosäure also zerstört. Da die auf der Peptidkarte getrennten Peptide meist eluiert wurden und für Aminosäureanalysen verwendet wurden, mußte diese Zerstörung möglichst geringfügig gehalten werden. Deshalb wurde das oben beschriebene Ninhydrinreagenz im Verhältnis 1:1 mit Athanol verdünnt und die Platte damit ganz vorsichtig besprüht. Nachdem eine Minute lang auf 110°C erhitzt worden war, waren die Flecken ganz schwach sichtbar. Der Verlust der N-terminalen Aminosäure und des Lysins konnte so teilweise unter 5 % gehalten werden.

Bevor die Peptide von der Platte eluiert wurden, wurde die ganze Platte mit Aceton gewaschen, um überschüssiges Ninhydrin zu entfernen. Dann wurden die Flecken abgekratzt und das Peptid mit 0,2 ml 5,7 n HCl extrahiert. Anschließend wurde sofort hydrolysiert.

4) Sequenzierung

Die wichtigste Methode zur Bestimmung der Aminosäuresequenz eines Proteins oder Peptids ist der stufenweise Abbau nach Edman²⁴⁾. Als Reagenz, das den Abbau bewirkt, dient Phenylisothiocyanat. Die Abbildung 1 zeigt die Reaktionsfolge für einen Zyklus.

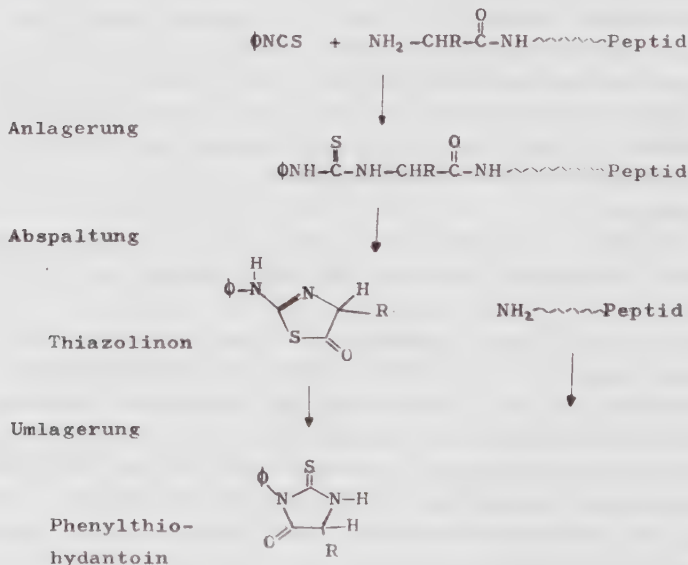


Abbildung 1: Reaktionsschema des Edman-Abbaus

Das Isothiocyanat reagiert in schwach basischem Milieu mit der freien Aminogruppe zum Thioharnstoffderivat. In wasserfreier Säure erfolgt die Zyklisierung zu einem Thiazolinon, die zur Abspaltung der ersten Aminosäure führt. Diese Phenylthiazolinon-Aminosäure kann durch

Extraktion mit einem hydrophoben Lösungsmittel leicht vom Restpeptid getrennt werden. Da dieses Derivat aber nicht stabil ist und sich deshalb zur Identifizierung nicht eignet, wird meist in wässriger Säure umgelagert zum Thiohydantoinderivat. Das Restpeptid kann erneut diesem Zyklus unterworfen werden.

Alle Reaktionsschritte verlaufen mit sehr großer Ausbeute, deshalb kann der Zyklus oft wiederholt werden, und man erhält immer noch eindeutige Resultate. Das Verfahren bietet sich zur Automatisierung an, und wegen der besseren Kontrollierbarkeit der Bedingungen und der besseren Reproduzierbarkeit erhält man mit den automatischen Sequenatoren auch die besten Ergebnisse. Es gibt im wesentlichen zwei automatische Verfahren, den Sequenator von Edman und Begg²⁵⁾, der sich sehr gut eignet für Proteine (mehr als 60 Aminosäuren) oder modifizierte, stark hydrophile Peptide²⁶⁾, und den Festphasensequenator nach Laursen²⁷⁾, bei dem die zu sequenzierenden Peptide an ein Harz angehängt werden. Der Festphasensequenator wurde von mir nicht verwendet. Zur Sequenzierung der Peptide wurde stattdessen mit der äußerst empfindlichen und einfach zu handhabenden Dansyl-Edmanmethode gearbeitet. Mit dem Proteinsequenator wurde die Sequenz im N-terminalen Bereich des intakten Proteins bestimmt.

Bevor ein Peptid dem stufenweisen Edmanabbau unterzogen wurde, wurde jeweils die N-terminale Aminosäure bestimmt, hauptsächlich um eine zusätzliche Reinheitskontrolle zu haben. Dafür gibt es mehrere Methoden, aber die Dansyltechnik ist wegen ihrer großen Empfindlichkeit allen anderen überlegen. Daher wurde nur diese Methode verwendet.

Durch enzymatischen Abbau mit Hilfe der Carboxypeptidasen kann die C-terminale Aminosäure und unter Umständen auch die Sequenz der letzten Aminosäuren bestimmt werden. In einigen Fällen wurde dies durchgeführt, um eine mit der Dansyl-Edmanteknik ermittelte Sequenz zu bestätigen.

a) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure mit der Dansyltechnik

Wie bei allen Methoden zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure wird auch bei der Dansyltechnik die freie Aminogruppe markiert, das Peptid anschließend hydrolysiert und dann die markierte Aminosäure identifiziert. Zur Markierung dient 1-Dimethylaminonaphtalin-5-Sulfonylchlorid, abgekürzt Dansylchlorid²⁸⁾. Die Strukturformel für dieses sehr wichtige Reagenz ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

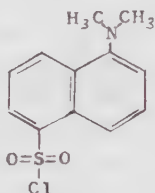


Abbildung 2: Dansylchlorid

Die Bindung zwischen der Aminogruppe und der Dansylgruppe (eine Sulfonsäureamidbindung) ist sehr Hydrolysebeständig. Das ist eine entscheidende Voraussetzung für die Zuverlässigkeit der Methode. Der große Vorzug dieser Technik liegt aber darin, daß die Dansylgruppe fluoresziert und daher ihr Nachweis in kleinsten Mengen möglich ist (etwa 0,1 nMol). Der Nachteil liegt darin, daß nicht hydrolysebeständige Aminosäuren nicht nachgewiesen werden können, das heißt vor allem, daß die Amide Glutamin und Asparagin immer als die entsprechenden Säuren gefunden werden.

Durchführung:

0,2 bis 1 nMol Peptid wurden in einem kleinen Gläschen getrocknet, 10 μ l 0,2 M NaHCO_3 zugegeben und wieder getrocknet (die Trocknung erfolgte jeweils im Exsikkator am Ölpumpenvakuum). Eine Lösung von Dansylchlorid in Aceton (2,5 mg/ml) wurde 1:1 mit Wasser verdünnt und 10 μ l dieser Mischung addiert. Man ließ 30 min bei 45°C

reagieren und trocknete dann. Danach wurde hydrolysiert, und zwar mit 20 λ 5,7 n HCl bei 105°C über Nacht. Das Hydrolysat wurde getrocknet und in 5 λ 95 % Äthanol aufgenommen. Zur Charakterisierung der markierten Aminosäure wurden Polyamidplättchen (DC-Fertigfolien F 1700 Mikropolyamid, Schleicher und Schüll, Dassel) in der Größe 5 x 5 cm verwendet. In einer Ecke wurde die Probe in einem möglichst kleinen Fleck aufgetragen, auf der Rückseite wurde genau gegenüberliegend eine Referenzmischung getupfelt (DNS-Pro, DNS-Ile, DNS-Phe, DNS-Gly, DNS-Ser, DNS-Glu, DNS-Arg). In der ersten Richtung wurde mit 1,5 % Ameisensäure als Laufmittel entwickelt. Dann wurde um 90° gedreht und Toluol:Essigsäure 10:1 als Laufmittel verwendet. Danach waren alle hydrophoben Aminosäuren eindeutig identifizierbar. Nach einer dritten Chromatographie in Essigsäureäthylester:Methanol:Essigsäure 20:1:1 (dieselbe Richtung wie die zweite Auftrennung) waren auch alle hydrophilen Aminosäuren getrennt und identifizierbar.

b) Carboxypeptidasen

Carboxypeptidase A spaltet C-terminale Aminosäuren mit aromatischer oder aliphatischer Seitenkette ab, Carboxypeptidase B entfernt die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin²⁹⁾. Da tryptische Peptide wegen der Spezifität von Trypsin als C-Terminus immer eine basische Aminosäure haben, wurde nur mit einem Gemisch der beiden Enzyme gearbeitet.

Etwa 20 nMol Peptid wurden gelöst in 0,2 ml N-Methylmorpholin/Essigsäure-Puffer pH 8,0. Dazu wurden je 10 γ Carboxypeptidase A und B gegeben und die Lösung bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Intervallen (z.B. 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h) wurde jeweils 30 λ dem Reaktionsgefäß entnommen, die Reaktion durch Zugabe von einem Tropfen Essigsäure gestoppt, getrocknet und auf dem Aminosäureanalysator die abgespaltene freie Aminosäure identifiziert.

c) Proteinsequenator

Zur Ermittlung der N-terminalen Sequenz des Proteins wurde ein von Wittmann-Liebold modifizierter Proteinsequenator³⁰⁾ der Firma Beckman (Palo Alto, USA) verwendet. Die Identifizierung der Thiohydantoinamino-säuren geschah auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60 F 254, Merck, Darmstadt) durch aufsteigende Chromatographie. Als Laufmittel zur Trennung der polaren Aminosäuren diente ein Gemisch Chloroform:Methanol 9:1, zur Trennung der unpolaren Aminosäuren wurde n-Heptan:Propionsäure:Dichloräthan 58:17:25 verwendet. Die Platten trugen einen Fluoreszenzindikator. Die Aminosäurederivate waren daher im UV-Licht als dunkle Flecken sichtbar. Die Identifizierung geschah durch Vergleich mit Referenzsubstanzen.

d) Dansyl-Edman-Technik

Diese Technik zur Sequenzierung von Peptiden nutzt die hohe Empfindlichkeit aus, die man bei der Identifizierung einer Aminosäure als ihr Dansylderivat erreichen kann.³¹⁾ Die Peptidkette wird nach der Edmanmethode schrittweise abgebaut, es wird aber nicht die abgespaltene Aminosäure nachgewiesen, sondern die jeweils N-terminale Aminosäure des Restpeptids über ihr Dansylderivat. Es muß daher von dem Restpeptid nach jedem Abbauschritt ein Aliquot abgenommen werden. Wegen der Empfindlichkeit der Nachweisreaktion reichen trotzdem kleine Mengen eines Peptids zur Sequenzierung aus.

Je nach der Länge des Peptids und der Menge an vorhandenem Material wurden etwa 10 bis 50 nMol Peptid eingesetzt. Sie wurden in einem kleinen Gläschen mit Schliffstopfen in 50 µl Wasser gelöst. Am Anfang von jedem Zyklus wurden 3 µl abgenommen und mit Dansylchlorid nach der bereits beschriebenen Methode die N-terminale Aminosäure bestimmt. Für den Edmanabbau wurde zu der Peptidlösung 50 µl 5 % Phenylisothiocyanat (PITC) in Pyridin gegeben (beide frisch destilliert; von Merck, Darmstadt). Nachdem mit Stickstoff gespült worden war, wurde verschlossen

und eine Stunde lang auf 45°C erhitzt. Dann wurde im auf 60°C vorgeheizten Exsikkator über NaOH und P₂O₅ an der Ölpumpe getrocknet. Zur Zyklisierung und Abspaltung wurde 0,1 ml frisch destillierte Trifluoressigsäure zugegeben und 30 Minuten bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde über NaOH getrocknet. Zur Entfernung der abgespaltenen Aminosäure wurde in 50 A Wasser aufgenommen und dreimal mit je 0,2 ml Essigsäure-n-Butylester extrahiert. Das Restpeptid befand sich in der Wasserphase. Diese wurde getrocknet und der Zyklus konnte von vorne beginnen.

Der Esterextrakt wurde nicht verworfen. Wenn der Dansyl-nachweis Glutaminsäure oder Asparaginsäure zeigte, konnte der entsprechende Esterextrakt zur Unterscheidung zwischen freier Säure oder Amid herangezogen werden. Im andern Falle wurde damit eine Rückspaltung durchgeführt.

Der Esterextrakt enthält ein Thiazolinonderivat der abgespaltenen Aminosäure. Durch Hydrolyse (Rückspaltung) kann daraus die entsprechende Aminosäure wieder gewonnen werden. Dazu wurde der Extrakt in einem Stickstoffstrom getrocknet. Dann wurden 0,2 ml 5,7 n HCl zugegeben. Es wurde abgeschmolzen und über Nacht bei 135°C hydrolysiert. Die freigesetzte Aminosäure wurde auf dem Aminosäure-analysator identifiziert. Threonin und Serin wurden bei der Hydrolyse weitgehend zerstört, Isoleucin wurde teilweise isomerisiert und ergab zwei Peaks, an der Stelle von Isoleucin und von Leucin.

e) Unterscheidung zwischen Glutaminsäure und Glutamin bzw zwischen Asparaginsäure und Asparagin

Bei der automatischen Sequenzierung macht diese Unterscheidung keine Schwierigkeiten, da der Nachweis über die jeweiligen Thiohydantoine erfolgt und diese unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Da bei der Dansyl-Edmanteknik vor der Identifizierung der Aminosäuren hydrolysiert wird, läßt sich immer nur die freie Säure nachweisen und es muß gesondert untersucht werden, ob im Protein die Säure oder das Säureamid vorlag.

Wenn zur Sequenzierung eine ausreichende Menge Material eingesetzt worden war, konnte dafür der Esterextrakt verwendet werden. Das darin enthaltene Thiazolinonderivat mußte umgelagert werden zum Thiohydantoin. Dazu wurde im Stickstoffstrom getrocknet und mit 0,3 ml 1 n HCl für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Trocknen wurde in 20 μ l Dichloräthan:Methanol 7:3 aufgenommen und wie beim Proteinsequenator beschrieben auf Kieselgelplatten chromatographiert. Da nicht, wie bei den Sequenatoren, Phenylthioharnstoff und andere Nebenprodukte der Anlagerungsreaktion vorher abgetrennt worden waren, enthielt der Esterextrakt meist störende Beimengungen, die im UV-Licht ebenfalls als dunkle Flecken sichtbar waren. Deshalb wurde die Kieselgelplatte mit einem Ninhydrinreagenz besprüht (100 mg Ninhydrin, 5 ml Collidin, 95 ml Äthanol) und 5 Minuten auf 100°C erhitzt. Dadurch wurden nur die Aminosäure-Thiohydantoinderivate angefärbt. Die Identifizierung geschah wieder durch Vergleich mit den entsprechenden Referenzen.

Wenn der Esterextrakt nicht genügend Material enthielt, wurde zur Unterscheidung zwischen Amid und Säure die elektrophoretische Beweglichkeit des entsprechenden Peptids bei pH 6,5 bestimmt³²⁾. Bei diesem pH-Wert sind alle basischen Gruppen protoniert (N-terminale Aminogruppe, Seitenkette von Lysin und Arginin), alle sauren Gruppen liegen als Anionen vor (C-terminale Carboxylgruppe, Seitenkette von Glutaminsäure und Asparaginsäure). Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Peptids im elektrischen Feld ist abhängig von der Nettoladung und dem Molekulargewicht. Bei bekanntem Molekulargewicht kann daher aus der Beweglichkeit die Ladung bestimmt werden. Damit kann in vielen Fällen auch eindeutig entschieden werden, ob eine Säure oder ein Säureamid vorliegt.

Schwierigkeiten treten auf, wenn Histidin vorhanden ist, da der pK_A -Wert des Imidazols in der Nähe von 6,5 liegt. Das bedeutet, daß je nach der Umgebung der Ring protoniert

oder nicht protoniert ist. Die Methode ist deshalb bei Histidin enthaltenden Peptiden nicht anwendbar.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des zu untersuchenden Peptids wird im Vergleich zu Asparaginsäure gemessen. Um endosmotische Effekte zu korrigieren, muß durch eine neutrale Aminosäure (Asparagin) der Nullpunkt festgelegt werden.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden die auch sonst benützten Zellulosedünnschichtplatten verwendet. Die Proben und die Referenzsubstanzen wurden bei trockener Platte in der Mitte aufgetragen, dann wurde die Platte gleichmäßig mit dem Elektrophoresepuffer besprüht. (Pyridin:Essigsäure:Wasser im Verhältnis 25:1:225, was einen pH-Wert von 6,5 ergibt). Für 75 Minuten wurde eine Spannung von 400 V angelegt. Nachdem die Flecken mit Ninhydrin sichtbar gemacht worden waren, wurde die relative Beweglichkeit gemessen und aus dem bei Offord³²⁾ gezeigten Diagramm (s. Abbildung 7) die Ladung bestimmt.

III ERGEBNISSE

1) Proteinisolierung

Die 50S-Proteine wurden, wie bereits beschrieben, vorfraktioniert durch Behandlung der intakten Untereinheit mit verschiedenen Konzentrationen von LiCl. Die erste Fraktion, UI, war praktisch frei von L30, die zweite Fraktion, UII, enthielt den größeren Teil von L30, ein kleinerer Teil verblieb in der dritten Fraktion, UIII.

Es wurde von mir nur die zweite Fraktion weiterverarbeitet, zum einen, weil sie den größeren Anteil an L30 enthielt, zum andern, weil in der dritten Fraktion auch das Protein L29 vorhanden war und vorherzusehen war, daß eine vollständige Trennung dieser beiden Proteine sehr schwierig sein würde. Denn sie unterscheiden sich praktisch nicht beim Elutionsverhalten auf der CM-Zellulosesäule¹²⁾ und sie haben sehr ähnliches Molekulargewicht, so daß auch eine Trennung mit Hilfe der Gelfiltration nicht zu erwarten war.

Die Fraktion UII enthielt in etwas wechselnden Mengenverhältnissen die Proteine L1, L2, L8, L9, L14, L15, L18, L19, L24, L25, L27 und L30. Dieses Gemisch wurde auf der CM-Zellulosesäule aufgetrennt. Dabei wurde L30 aber nicht vollständig von den anderen Proteinen abgetrennt. Die Fraktionen, in denen L30 eluiert wurde, enthielten noch L14, L18, L25 und kleine Mengen von größeren Proteinen.

Dieses Gemisch wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G100 aufgetrennt. Die Trennung zwischen L25 und L30 war nicht vollständig. Es gab einen überlappenden Bereich, der beide Proteine enthielt. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und noch einmal über dieselbe Säule getrennt.

Die Abbildung 3 zeigt in schematischer Darstellung alle Trennschritte, die durchgeführt wurden, um reines L30

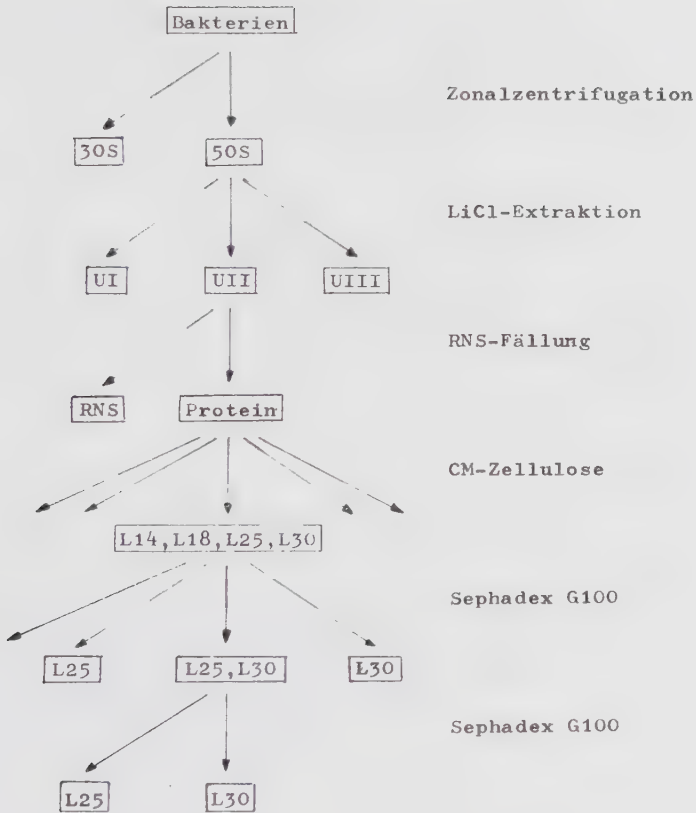


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Isolierung von L30

zu erhalten. Aus 250 g Bakterien konnten etwa 3 g 50S-Untereinheiten erhalten werden. Daraus ließen sich 3 bis 5 mg reines L30 isolieren.

Ein Teil des verwendeten Materials wurde mir vom Institut zur Verfügung gestellt.

2) Aminosäurezusammensetzung von L30

Es wurden 12 unabhängige Totalhydrolysen des Proteins gemacht und ausgewertet. Dazu wurde Material aus drei verschiedenen Aufarbeitungen verwendet, das sich auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese, der Discelektrophorese und bei der Peptidkarte der tryptischen Peptide als rein erwiesen hatte.

L30 enthält kein Tyrosin, kein Tryptophan und kein Cystein. Das Fehlen von Tyrosin ergab sich aus den Totalhydrolysen. Für Tryptophan und Cystein wurden mehrmals die in Material und Methoden beschriebenen Tests durchgeführt, wobei sich jedesmal ergab, daß die betreffende Aminosäure nicht vorhanden war.

Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte aus allen Hydrolysen. Dabei wurde gleich auf die richtige Länge des Proteins bezogen und so die Anzahl der Aminosäurereste angegeben. Die Werte stimmen mit den zu erwartenden Werten sehr gut überein. Methionin weicht etwa stärker ab, weil es bei der Hydrolyse teilweise zerstört wird. Dasselbe gilt für Threonin. Am schlechtesten sind die Werte für Asparaginsäure und für Leucin. Das kann nur mit schwer abtrennbaren Verunreinigungen erklärt werden. So zeichneten sich Chargen, die sich bei der Trypsinpeptidkarte als nicht ganz sauber erwiesen hatten, bei der Hydrolyse immer durch einen noch höheren Wert für Asparaginsäure aus. Zum Vergleich sind in Tabelle 1 auch die bisher in der Literatur veröffentlichten Werte angegeben. Auch diese zeigen alle zu viel Asparaginsäure.

Da zwanzigstündige Hydrolyse bei manchen Bindungen nur zu unvollständiger Spaltung reicht, wurden mehrere lang-

	a)	b)	c)	d)	e)
Asx	2	2,29	3,5	2,3	2,4
Thr	6	5,68	5,1	5,2	5,8
Ser	2	1,96	2,5	2,0	2,1
Glx	5	5,04	5,0	5,0	5,2
Pro	2	1,91	2,0	2,1	2,0
Gly	5	5,05	4,6	5,2	5,0
Ala	5	4,92	5,5	5,4	4,8
Val	4	4,09	4,5	4,0	4,3
Met	2	1,60	1,6	1,5	1,5
Ile	6	6,02	4,9	5,5	6,1
Leu	5	5,25	4,2	5,4	5,0
Tyr	-	-	0,3	-	-
Phe	1	0,99	1,3	1,2	1,2
His	2	1,90	1,8	2,0	1,9
Lys	5	5,06	5,6	5,5	4,9
Arg	6	5,87	5,6	5,9	5,7

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung von L30

a) aus der Primärstruktur sich ergebende Werte

b) Mittelwerte der Hydrolysen

c) Werte von Kaltschmidt u.a.³³⁾

d) Werte von Mora u.a.³⁴⁾

e) Werte von Pearson u.a.³⁵⁾

dauernde Hydrolysen durchgeführt (48 und 70 Stunden). Dabei ergaben sich außer zunehmender Zerstörung mancher Aminosäuren keine Veränderungen. Vor allem der Wert für Leucin wurde nicht höher. Das bedeutet, daß der relativ stark von einer ganzen Zahl abweichende Leucinwert nicht mit unvollständiger Hydrolyse erklärt werden kann.

3) Trennung der tryptischen Peptide

Etwa 15 mg Protein wurden mit Trypsin gespalten und die Peptide auf einer großen SE-Zellulosesäule aufgetrennt. Die Abbildung 4 zeigt das Elutionsmuster. Die Peptide sind entsprechend ihrem RF-Wert auf Zellschichtplatten eingezeichnet. Sie wurden nach der Reihenfolge der Elution numeriert.

Wie man aus der Abbildung 4 sieht, ist T13 das einzige Peptid, das sofort rein erhalten wurde. Alle anderen Peptide mußten nachgetrennt werden.

Die Gruppe der neutralen Peptide (Fraktion 80 bis 120) wurde in drei Sammelfractionen geteilt. Diese wurden jeweils über Dowex M71 nachgetrennt, wodurch alle Peptide rein erhalten wurden.

Das Peptid T14 wurde über eine Zellschichtsäule von T13 abgetrennt.

Die Trennung der beiden sauren Peptide T1 und T2 bereitete einige Schwierigkeiten. T2 war bei der Papierchromatographie und auch später bei der Zellschichtchromatographie nicht sichtbar. Es wurde nur auf Grund von Hydrolysen gefunden. Deshalb ist auch der RF-Wert nicht bekannt und als 0 in Abbildung 4 eingezeichnet. Die Ursachen, weshalb T2 sich nicht sichtbar machen läßt, sind nicht bekannt. Es könnte daran liegen, daß es bei der Chromatographie nicht als scharfer Fleck wandert, sondern stark verschmiert. Dafür gibt es einige Hinweise. Ein weiterer Grund ist, daß es immer nur in kleinen Mengen vorhanden war.

Ein Teil der T2 enthaltenden Fraktion wurde auf Dowex M71 nachgetrennt. Diese Trennung verlief sehr unbefriedigend. Deshalb wurde der andere Teil auf Sephadex G15 gegeben. Bei der Elution erschien T2 als sehr breiter, flacher Peak vor T1. In keinem Fall konnte das Peptid ganz frei von Verunreinigungen erhalten werden.

Die erwähnten Trennoperationen ergaben 14 verschiedene Peptide. Die Tabelle 2 zeigt deren experimentell gefun-

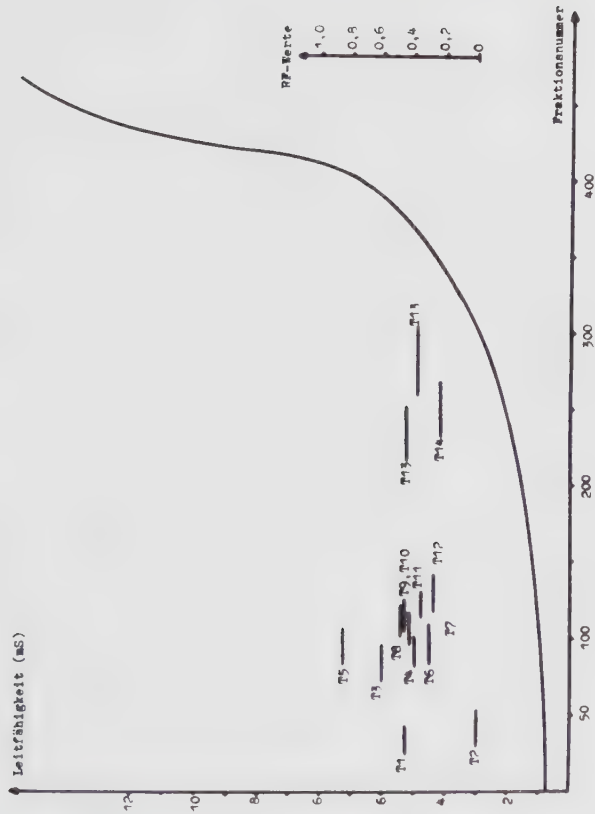


Abbildung 4: Trennung der tryptischen Peptide auf der großen SE-Zellulosesäule

	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Arg
T1			2,01					1,00							
T2	1,09		1,05			1,20	1,02	1,00	0,76	0,95		0,67			
T3	1,08		1,08			1,20	1,15	2,05	1,83	0,93		0,86		C,88	
T4	1,04	0,95		1,16	0,95		0,92			0,93					1,00
T5		0,97				2,20	0,94				3,92				0,94
T6															1
T7		1,96		1,12						1,01					0,89
T8			0,92			1,04	0,96			0,96					1,09
T9					1,03						0,98			1,01	
T10		0,99								1,05				0,96	
T11								1,03	0,86					1,13	
T12							1,02							0,98	
T13		1,02		1,15		1,13		1,00		1,00			0,94		1,00
T14													1,00	1,00	

Tabelle 2: Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide, nach der Trennung über Säulen

	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Ieu	Phe	His	Lys	Arg
T1				2				1							
T2	1		1			1	1	1	1	1		1			
T3	1		1			1	1	2	2	1		1		1	
T4	1						1			1					1
T5		1		1		2	1				4				1
T6															1
T7		2		1						1					1
T8			1			1	1			1					1
T9					1						1			1	
T10										1				1	
T11		1						1	1					1	
T12							1							1	
T13		1				1		1		1			1		1
T14													1	1	

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide

dene Aminosäurezusammensetzung. In Tabelle 3 sind die entsprechenden gerundeten ganzen Zahlen wiedergegeben.

Da Trypsin sehr spezifisch ist und nur nach Lysin und Arginin spaltet, war eigentlich nur ein Peptid zu erwarten, das weder Lysin noch Arginin enthält, und zwar das C-terminale. Sowohl die Analysen von T1 als auch die von T2 zeigten aber kein Lysin und kein Arginin. Dieser Befund konnte zunächst nicht erklärt werden. Erst bei der Sequenzierung der Peptide stellte sich heraus, daß T2 ein Bruchstück von T3 war. Die Ergänzung war das Peptid T11. Damit war auch verständlich, warum diese beiden Peptide nur in kleinen Mengen isoliert werden konnten. Außerdem ergab sich nur unter Berücksichtigung dieser Tatsache eine gute Übereinstimmung zwischen der experimentell ermittelten Aminosäurezusammensetzung und den sich durch die Summe der tryptischen Peptide ergebenden Werten.

Die Spaltung nach dem Phenylalanin, die zu T2 führt, wurde nur bei dieser einen tryptischen Verdauung beobachtet. Es ist aber möglich, daß sie auch bei anderen Ansätzen auftrat und nur die Peptide T2 und T11 nicht gefunden wurden. Da T2 bei Papier- oder Dünnschichtchromatographie nie sichtbar war, war ohnedies nicht zu erwarten, daß es von einer Peptidkarte isoliert werden könnte. Bei T11 war vorherzusehen, daß es wegen teilweiser Oxydation des Methionins in zwei Flecken erscheint. Wenn es nun von vornherein schon in kleiner Menge vorhanden war, könnte es leicht auf einer Peptidkarte nicht sichtbar gewesen sein.

Auf Grund des in der Literatur angegebenen Molekulargewichts (s.u.) wurde ein größeres Protein erwartet, als es der Summe der tryptischen Peptide entsprach. Daher entstand der Verdacht, ein größeres Bruchstück könnte von der Säule nicht eluiert worden sein. So wurde nochmals eine Trypsinspaltung gemacht und die Peptide über Sephadex G15 vorgetrennt, um die großen Peptide zu

isolieren. Zur Nachtrennung wurde eine kleine SE-Zellulosesäule verwendet. Es wurden aber nur die bereits bekannten Peptide gefunden. Vor allem große Peptide waren nicht vorhanden.

4) Peptidkarte der tryptischen Peptide

Die Abbildung 5 zeigt eine Peptidkarte der tryptischen Peptide. Der Auftragspunkt liegt unten rechts. In der schematischen Darstellung der Abbildung 6 sind die einzelnen Flecken charakterisiert. Durch diese Technik wurden alle Peptide getrennt bis auf T9 und T10. T5 war manchmal schwer zu sehen, da es in dem PBEW-System sehr nahe an der Front lief, wo auch gelbe Zeretzungsprodukte des Pyridins auftraten, die die Ninhydrinreaktion offensichtlich erschwerten. T3 gab einen sehr langgezogenen Fleck, der nicht immer sichtbar war. T13 war immer in zwei verschiedenen Flecken zu finden, wie es auch schon von der SE-Zellulosesäule in zwei Peaks eluiert worden war. Eine Erklärung dafür war nicht zu finden. Zwischen den Peptiden T8 und T9 wurde manchmal nicht vollständig gespalten, so daß ein Brückenpeptid entstand. Auf dem abgebildeten Fingerprint ist dieses Brückenpeptid zu sehen. In der Abbildung 6 wurde es als T(8+9) gekennzeichnet.

Von mehreren Peptidkarten wurden die Flecken eluiert und analysiert. Tabelle 4 zeigt die dabei gefundenen Werte. Man sieht aus dem Vergleich mit Tabelle 3 und Tabelle 2 wie zuverlässig die so gewonnenen Analysen sein können. Wenn allerdings weniger Material eingesetzt wurde oder stärker mit Ninhydrin besprüht wurde, konnten die N-terminale Aminosäure und die Lysine bis zu 50 % zerstört sein.

T2 und T11 sind in Tabelle 4 nicht enthalten, da sie auf keiner Peptidkarte gefunden wurden. Die Werte für T3 sind relativ ungenau, was vielleicht hauptsächlich daher kommt, daß das Peptid über eine große Fläche

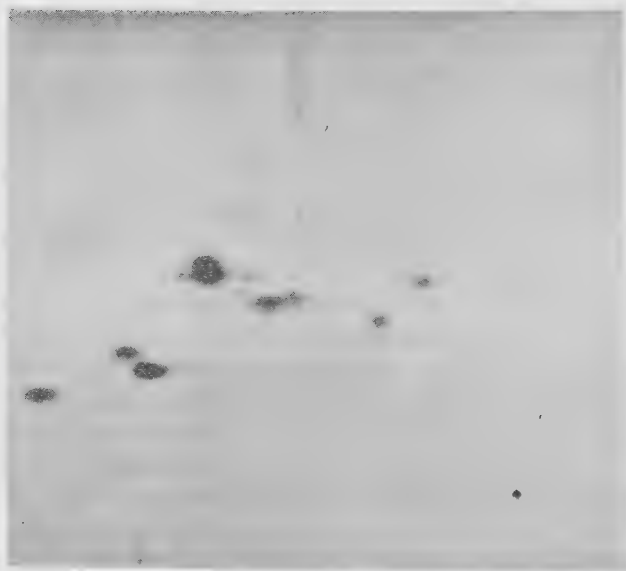


Abbildung 5: Peptidkarte der tryptischen Peptide

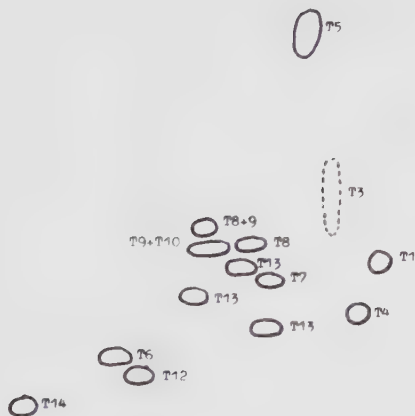


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Peptidkarte
der tryptischen Peptide

	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Arg
T1				2,09				<u>0,91</u>							
T3	1,21		1,24			<u>1,31</u>	1,23	1,96	1,43	0,93		0,62		0,78	
T4	1,00	1,07		<u>1,03</u>	0,95		<u>0,99</u>			0,94					0,98
T5		1,06				2,26	<u>0,86</u>				3,81				0,98
T6															1
T7		1,92		1,22						<u>0,99</u>					1,07
T8			<u>0,80</u>			1,18	0,91			1,10					0,98
T9+T10		<u>1,12</u>			0,83					1,16	<u>0,93</u>			1,93	
T12							<u>1,00</u>							1,00	
T13	1,08		1,01			1,27		0,87		<u>0,73</u>			0,80		1,25
T14													<u>1,00</u>	<u>1,00</u>	

Tabelle 4: Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide, nach der Trennung über eine Peptidkarte (unterstrichene Aminosäure = N-terminal)

verteilt war und deshalb viel Verunreinigung mit extrahiert wurde. Außerdem war erfahrungsgemäß die Hintergrundverunreinigung im sauren Bereich der Peptidkarte immer am größten.

Das Muster der tryptischen Peptidkarte war sehr gut reproduzierbar. Deshalb konnte daraus ein Reinheitskriterium gemacht werden. Verunreinigungen waren sehr leicht und mit hoher Empfindlichkeit erkennbar als ein Hintergrund von vielen schwachen Flecken. Präparationen ohne einen solchen Hintergrund zeigten immer nur die in Abbildung 5 und 6 gezeigten Flecken.

5) Sequenzierung

a) Proteinsequenator

Mit dem Proteinsequenator konnte die Sequenz bis Position 23 bestimmt werden. Danach war eine eindeutige Aussage nicht mehr möglich, weil der Abbau nicht mehr synchron verlief. Die Ergebnisse wurden durch drei verschiedene Läufe gesichert. Die Peptide T7, T8, T9, T10, T12 und T14 waren damit in ihrer Sequenz und Zuordnung geklärt.

b) Sequenzierung der tryptischen Peptide

Die übrigen tryptischen Peptide wurden alle nach dem Dansyl-Edmanverfahren sequenziert. Im folgenden werden bei allen Peptiden die Ergebnisse aufgeführt. Die Reihenfolge entspricht der Anordnung im Protein.

T12: Ala-Lys

Die Sequenz ergibt sich aus der Aminosäurezusammensetzung und der Spezifität von Trypsin. Sie wurde durch den Proteinsequenator bestätigt.

T10: Thr-Ile-Lys

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure mit Dansylchlorid ergab unter Berücksichtigung der Bruttoanalyse und der Spezifität von Trypsin die Sequenz. Sie wurde durch den Proteinsequenator bestätigt.

T7: Ile-Thr-Gln-Thr-Arg

Die Sequenz ergab sich durch den Proteinsequenator. Die Identität des Peptids wurde durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäure gesichert.

T8: Ser-Ala-Ile-Gly-Arg

Es gilt das bei T7 Gesagte. Eine Graufärbung des Fleckes mit Ninhydrin wies bereits auf Ser als N-terminale Aminosäure hin.

T9: Leu-Pro-Lys

Es gilt dasselbe wie bei T10

T14: His-Lys

Es gilt dasselbe wie bei T12.

T5: Ala-Thr-Leu-Leu-Gly-Leu-Gly-Leu-Arg

Diese Sequenz wurde nicht mehr durch den Proteinsequenator erhalten. Sie wurde ganz mit der Dansyl-Edmanmethode bestimmt. Die Reihenfolge der letzten drei Aminosäuren wurde durch Abspaltung mit Carboxypeptidase A und B bestätigt.

T6: Arg

Durch Aminosäureanalyse ohne vorhergehende Hydrolyse wurde bestätigt, daß es sich um ein einzelnes Arginin handelt.

T13: Ile-Gly-His-Thr-Val-Glu-Arg

Der Dansyl-Edmanabbau lieferte die gesamte Sequenz. Es mußte aber gesondert untersucht werden, ob die vorletzte Aminosäure Glu oder Gln ist. Dazu konnte nicht die Elektrophorese dieses Peptids bei pH 6,5 herangezogen werden, da das Histidin stören würde. Auch über das entsprechende Thiohydantoin war diese Entscheidung nicht zu treffen, da die eingesetzte Menge zu klein war. Deshalb wurde das Thermolysinpeptid Th9 (s. Abb.10) herangezogen, mit dem eine Elektrophorese bei pH 6,5 durchgeführt wurde. Das Peptid mußte nicht vorher gereinigt werden, da die Elektrophorese und eine anschließende Chromatographie im PBEW-System dafür ausreichten. Die Identität des Peptids ergab sich aus dem elektrophoretischen Verhalten (es mußte negativ geladen sein) und aus dem bekannten RF-Wert und wurde durch eine Aminosäureanalyse bestätigt.

T4: Glu-Asp-Thr-Pro-Ala-Ile-Arg

Die Sequenz wurde mit der Dansyl-Edmanmethode bestimmt. Der Abbau durch Carboxypeptidase A und B lieferte Ile und Arg und diente damit als Bestätigung für die letzten beiden Aminosäuren. Die Elektrophorese bei pH 6,5 zeigte eine negative Ladung. Damit

war gezeigt, daß zwei Säuregruppen vorliegen mußten. Es konnte sich bei den ersten beiden Aminosäuren also nur um Asp und Glu handeln.

T3: Gly-Met-Ile-Asn-Ala-Val-Ser-Phe-Met-Val-Lys

Zur Sequenzierung wurden die Peptide T2 und T3 verwendet. Da beide Peptide nur in kleiner Menge vorhanden waren, gelang zunächst keine vollständige Sequenzaufklärung. Deshalb wurde das Brückenpeptid E4 (s. Abb.10), das die Peptide T3 und T1 enthielt und aus der Trypsinspaltung nach Blockierung mit ETPA stammte, in größerer Menge isoliert und mit der Dansyl-Edmanmethode ganz sequenziert. Dabei reichte das Material auch aus, um über das Thiohydantoin die Unterscheidung zwischen Asp und Asn treffen zu können.

T11: Met-Val-Lys

Aus der Bruttozusammensetzung, der Bestimmung der N-terminalen Aminosäure und der Spezifität von Trypsin ergab sich die Sequenz. Die Sequenzaufklärung von T2 und T3 zeigte, daß T11 ein Teil von T3 ist. Durch die Ermittlung der Reihenfolge der tryptischen Peptide wurde außerdem ausgeschlossen, daß T11 auch noch an anderer Stelle als ein eigenständiges tryptisches Peptid auftrat.

T1: Val-Glu-Glu

Die Sequenz wurde mit der Dansyl-Edmanmethode bestimmt. Sie wurde bestätigt durch die Sequenzierung des Peptids E4. Die Elektrophorese bei pH 6,5 zeigte zwei negative Ladungen. Es mußten daher zwei Glutaminsäuren vorliegen.

c) Ladungsbestimmung mit Hilfe der Elektrophorese

Bei den Peptiden T1, T4 und Th9 wurde, wie bereits erwähnt, die elektrophoretische Beweglichkeit bestimmt. Die Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse. Jede Messung wurde mindestens zweimal durchgeführt. In Abbildung 7 ist das von Offord³²⁾ entwickelte Diagramm wiedergegeben. Darin sind die entsprechenden Punkte für die Peptide eingezeichnet.

	Molekulargewicht	rel. Beweglichkeit	Ladung
T1	373	0,89	-2
T4	760	0,35	-1
Th9	916	0,55	-2

Tabelle 5: Ladungsbestimmung mit Hilfe der Elektrophorese

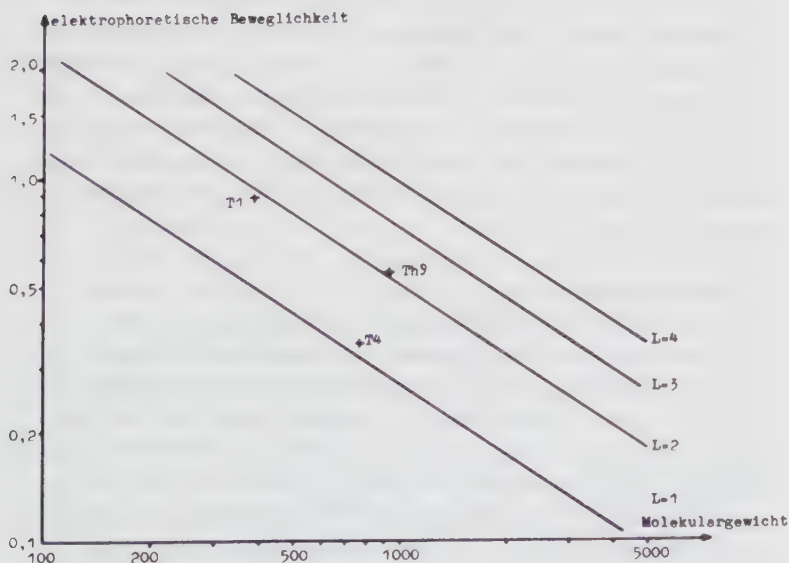


Abbildung 7: Diagramm von Offord zur Ladungsbestimmung von Peptiden.

L = Ladung

6) Reihenfolge der tryptischen Peptide

Um die Reihenfolge der tryptischen Peptide aufzuklären, wurden die übrigen, in Material und Methoden beschriebenen Spaltungen durchgeführt. Es reichte dabei, die Bruttozusammensetzung der entstandenen Bruchstücke zu ermitteln, um, bei Berücksichtigung der Spezifität der Spaltung, eine eindeutige Zuordnung vornehmen zu können. Um eine Aminosäureanalyse machen zu können, war jedoch eine Auftrennung auf einer Peptidkarte ausreichend. So konnte die benötigte Information mit sehr wenig Material und in kurzer Zeit erhalten werden.

Deshalb wurden bei all diesen Spaltungen nur Peptidkarten hergestellt und daraus die Peptide analysiert. Nur eine Blockierung mit ETPA und anschließende Spaltung mit Trypsin wurde mit so viel Material durchgeführt, daß eine anschließende Trennung über eine Säule möglich war. Da in diesem Fall hauptsächlich auf das saure Peptid E4 Wert gelegt wurde, wurde als Trennmateriale Dowex M71 gewählt.

a) Thermolysinspaltung

Es wurden drei unabhängige Spaltungen mit Thermolysin durchgeführt. Dazu wurden jeweils etwa 20 nMol Protein eingesetzt. Dann wurden Peptidkarten angefertigt und die Flecken analysiert. Es zeigte sich, daß bei der Arbeit mit so kleinen Mengen die Bedingungen nicht ganz konstant gehalten werden konnten, so daß an Stellen, an denen das Enzym langsam spaltet, die Spaltung bei verschiedenen Versuchen mit unterschiedlicher Ausbeute verlaufen konnte. Deshalb waren die Peptidkarten nicht vollständig reproduzierbar. Dasselbe gilt für die Spaltung mit Chymotrypsin, nicht aber für Trypsin, wegen dessen viel größerer Spezifität.

Die eindeutig charakterisierten thermolytischen Peptide sind in Abbildung 10 eingezeichnet. Sie wurden gemäß ihrer Reihenfolge im Protein numeriert. Man sieht an den unvollständigen Spaltungen, daß Thermolysin

weniger spezifisch ist als Trypsin. Die Resultate der Aminosäureanalysen der einzelnen Peptide wurden in Tabelle 6 eingetragen. Es wurde nicht auf jeder Peptidkarte jedes Peptid gefunden. Die Werte stammen daher von verschiedenen Spaltungen. Zwei der drei Peptidkarten waren zu stark mit Ninhydrin besprüht worden, was man an der starken Zerstörung der N-terminalen Aminosäure (jeweils unterstrichen) und der Lysine erkennen kann. Diese Zerstörung ist zwar meist unerwünscht, kann aber auch über die Identifizierung der N-terminalen Aminosäure die Zuordnung eines Peptids erleichtern.

Die Abbildung 8 zeigt eine Peptidkarte der thermolytischen Peptide. In der schematischen Darstellung darunter sind die einzelnen Flecken durch die Nummer des Peptids charakterisiert. Die nicht bezeichneten Flecken konnten nicht identifiziert werden, entweder weil sie zu wenig Material enthielten, oder weil die Analysen zu starke Verunreinigungen aufwiesen. Es wurden zwei Peptide gefunden, die nur aus Glycin und Leucin bestanden und daher aus dem Bereich des tryptischen Peptids T5 stammen mußten. Da aber diese Peptide nicht sequenziert wurden und daher vor allem ihre Länge nicht bekannt war, konnten sie nicht eindeutig eingeordnet werden. Sie wurden in der Abbildung 9 mit x bezeichnet.

b) Chymotrypsinspaltung

Auch mit Chymotrypsin wurden mehrere Spaltungen durchgeführt und die entstandenen Peptide jeweils auf Dünnschichtplatten als Peptidkarten getrennt. Alle Peptide, die sauber isoliert werden konnten, sind in die Abbildung 10 eingezeichnet. Die Tabelle 7 gibt die entsprechenden Aminosäureanalysen wieder.

Der Verlauf der Spaltung war stark von der Reaktionszeit und dem Enzym:Substrat-Verhältnis abhängig. So zeigte eine der fünf Peptidkarten nur wenige große Spaltprodukte, z.B. Ch3 und Ch5. Bei längerer Reaktionszeit bzw. größerem Enzym:Substrat-Verhältnis traten

	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Arg
Th1	1,19						<u>0,88</u>			<u>1,1</u>				0,91	
Th2		2,01	1,14	1,20						<u>0,75</u>				0,9	
Th3		2,04	0,90	1,12						<u>1,52</u>				0,58	1,05
Th4a		2,03	1,01	1,14			0,86			<u>1,52</u>				0,56	0,95
Th4b					0,83	1,18	<u>0,52</u>			1,00	1,10		0,92	1,48	0,99
Th5a		1,06			0,89	1,16	<u>1,56</u>			0,89	0,94		0,96	1,53	1,09
Th5b					0,88	1,24				<u>0,94</u>	1,13		1,06	1,93	1,01
Th5c							<u>0,8</u>								
Th6	1,2										<u>0,70</u>				2,00
Th7										<u>0,90</u>			1,03		
Th8	0,98				1,16										
Th9	1,05	0,98		2,02	0,96		1,04	<u>0,22</u>						0,97	
Th10					1,09				0,80		<u>0,99</u>			1,11	
Th11	1,00					1,02				<u>0,96</u>					
Th12		0,9					<u>1,1</u>								
Th12a		1,08					<u>0,90</u>					1,02			
Th13									1,2			<u>0,8</u>			
Th14							<u>1,0</u>							1,0	
Th14a				2,08			2,00	<u>0,52</u>						0,56	
Th14b				2,36			<u>1,87</u>							0,77	
Th15				2,0			<u>0,6</u>								

Tabelle 6: Aminosäureanalysen der thermolytischen Peptide

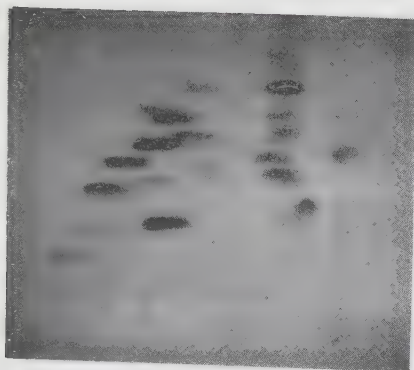


Abbildung 8: Peptidkarte der thermolytischen Peptide



+

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Peptidkarte der thermolytischen Peptide

	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Arg
Ch1		2,78		1,25			<u>0,92</u>			2,21				1,85	
Ch2		1,24	0,96		0,75	1,33	2,16			0,85	3,11		1,07	1,80	<u>2,01</u>
Ch3		4,06	1,17	1,13	1,13	1,07	<u>2,99</u>			3,01	3,16		1,02	3,85	1,89
Ch4						1,23				0,97			1,03		<u>1,65</u>
Ch5	1,99	2,04	1,05	2,24	1,18	2,07	2,02	2,06	0,67	2,89		0,85	0,90		<u>2,58</u>
Ch6	1,07		0,79				1,07	1,11		<u>0,72</u>		1,10			
Ch7				2,20				1,98	<u>0,62</u>					0,82	

Tabelle 7: Aminosäureanalysen der chymotryptischen Peptide

immer mehr, teilweise recht ähnliche Peptide auf, für deren vollständige Trennung das Auflösungsvermögen der Peptidkartentechnik nicht mehr ausreichte. Die Aminosäureanalysen zeigten dann teilweise starke Verunreinigungen, die eine eindeutige Identifikation erschwerten. In Tabelle 7 und Abbildung 10 wurden solche Peptide nicht aufgenommen.

a) Spaltung mit Staphylococcus Protease

Dieses Enzym spaltet L30 erkennbar nur an einer Stelle, nach der Glutaminsäure in Position 38. Die Trennung der beiden Bruchstücke gelang mit der Peptidkartentechnik. Das Verhalten des C-terminalen Bruchstückes zeigte dabei zwei Varianten: in zwei Fällen erschien es als Fleck in ähnlicher Position wie das tryptische Peptid T3, in zwei Fällen blieb es am Start sitzen, wahrscheinlich weil es ein unlösliches Aggregat gebildet hatte.

In einem Fall wurde außerdem eine unspezifische Spaltung nach dem Phenylalanin in Position 52 beobachtet, wie bei der ersten Spaltung mit Trypsin.

Von den drei möglichen Spaltstellen des Proteins wurde offensichtlich nur an einer gespalten. Es wurde in keinem der vier Fälle eine einzelne Glutaminsäure gefunden, die vom C-Terminus stammen würde, noch trat ein Zweierpeptid aus Arginin und Glutaminsäure auf, das von einer Spaltung nach den Glutaminsäuren in Position 36 und 38 herrühren würde. Auch die entsprechenden kürzeren Formen der Peptide SP1 und SP2 wurden nicht gefunden.

Die Aminosäureanalysen dieser beiden Peptide sind in der Tabelle 8 dargestellt. Auch das bis zum Phenylalanin in Position 52 reichende Bruchstück ist dort aufgeführt. (Die zu hohen Werte für Serin und Glycin sind Verunreinigungen, die in dem Bereich der Peptidkarte öfter auftraten). Alle drei Peptide sind außerdem in Abbildung 10 eingezeichnet.

	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Arg
E1		3,02		1,24			<u>1,08</u>			1,98				1,67	0,98
E2		1,09			1,07	2,34	1,20				4,56		1,08	1,57	0,77
E3	0,98	1,93		2,17	1,17	1,07	1,11	1,02		1,81			0,95		1,75
E4	1,11		1,16	1,85		<u>1,02</u>	<u>1,05</u>	3,20	1,54	0,88		1,08		0,87	
CP1		4,33	1,34	3,17	1,17	4,03	<u>2,18</u>	0,93		3,69	5,20		1,94	3,32	5,03
CP2	<u>2,01</u>	1,05	0,29	2,13	1,21	1,05	1,94	2,86	1,64	2,05		0,76		1,01	0,98
CP2a	<u>1,77</u>	1,02	1,49		1,02	1,65	2,03	1,15	0,73	1,94		1,06			1,04
N1	1,06	5,95	1,05	3,06	1,91	4,72	<u>2,36</u>	1,00		5,24	5,11		2,07	3,57	6,09
N2	1,03		0,95				1,08	1,07		<u>0,73</u>		1,14			
N3				2,09			<u>1,92</u>							0,93	

Tabelle 8: Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide nach ETPA-Blockierung (E1 - E4),
der Peptide nach Spaltung mit Staphylococcus Protease (SP1 - SP2a),
der Peptide nach Bromcyanspaltung (N1 - N3).

d) Trypsinspaltung nach der Blockierung mit ETPA

Diese Spaltung sollte sehr spezifisch und sehr vollständig nur nach Arginin erfolgen. Es waren daher drei größere Spaltprodukte zu erwarten (in Abbildung 10 als E1, E2 und E4 bezeichnet) sowie die aus der normalen Trypsinspaltung bekannten Peptide T4, T6, T8 und T13. Diese Produkte wurden auch alle gefunden. Daneben wurde aber auch noch das aus T13 und T4 bestehende Peptid E3 isoliert, und zwar jedes Mal bei drei verschiedenen Versuchen. Bei einer normalen Trypsinspaltung wurde eine unvollständige Spaltung nach dem betreffenden Arginin jedoch nicht beobachtet. Es scheint sich hier um einen sekundären Effekt zu handeln, der wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung, die durch die Modifizierung der Lysine ausgelöst wurde, bedingt ist.

Die Blockierung der Lysine war in allen Versuchen offensichtlich nicht ganz vollständig, denn es wurden in kleinen Mengen verschiedene andere Peptide gefunden, die aus unvollständigen Spaltungen nach einzelnen Lysinen stammten.

Die Blockierung und Spaltung wurde zweimal in kleinem Ansatz durchgeführt und zur Trennung die Peptidkartentechnik verwendet. Bei einem dritten Ansatz wurden etwa 4 mg Protein eingesetzt. Das Ziel war dabei, das Peptid E4 in größerer Menge zu erhalten, um die Sequenz des C-terminalen Bereichs bestätigen zu können. Zur Trennung wurde in diesem Fall eine Ionenaustauschersäule mit Dowex M71 gewählt. Beim Auftragen auf diese Säule blieb ein unlöslicher Rückstand, der abzentrifugiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen zeigte die Aminosäureanalyse, daß es sich um das Peptid E4 handelte, das so in reiner Form erhalten wurde. Es war allerdings nicht vollständig unlöslich gewesen. Im Eluat wurde in den ersten Fraktionen in zwei Peaks nochmals das Peptid E4 gefunden. Auf der Peptidkarte wanderte E4 weder im elektrischen Feld noch im PBEW-System und wurde daher immer am Start gefunden.

Die Aminosäureanalysen der Peptide E1 bis E4 sind in der Tabelle 8 wiedergegeben.

e) Bromcyan-Spaltung

Die chemische Spaltung mit Bromcyan lieferte erwartungsgemäß drei Bruchstücke, die mit der Peptidkartentechnik getrennt wurden. Bei mehreren Versuchen ist die Spaltung offensichtlich jedesmal mit großer Ausbeute verlaufen, denn es wurden keine überlappenden Bruchstücke gefunden.

Die Spaltung mit Bromcyan erfolgt nach Methionin, das dabei in Homoserin umgewandelt wird. Die C-terminale Aminosäure der entstandenen Peptide ist daher immer Homoserin. Dies wird bei der Hydrolyse teilweise zum Lacton zyklisiert, und auf dem Aminosäureanalysator erscheinen daher immer zwei Peaks, einer zwischen Serin und Glutaminsäure und einer, für das Lacton, in der Gegend von Histidin (beim Durrum Aminosäureanalysator). Wegen dem unterschiedlichen Grad der Zyklisierung konnten diese Peaks schwer quantitativ erfaßt werden.

Bei den Aminosäureanalysen des Peptids N1 waren diese beiden Peaks immer sichtbar. Das Peptid N2 ergab meist zwei Flecken, wobei ein Fleck bei der Analyse kein Homoserin zeigte. Es ist daher möglich, daß auch hier eine partielle, unspezifische Spaltung nach dem Phenylalanin in Position 52 stattgefunden hat.

Die drei entstandenen Peptide sind in Abbildung 10 eingezeichnet. Die Ergebnisse der Aminosäureanalysen sind in Tabelle 8 mit aufgenommen worden.

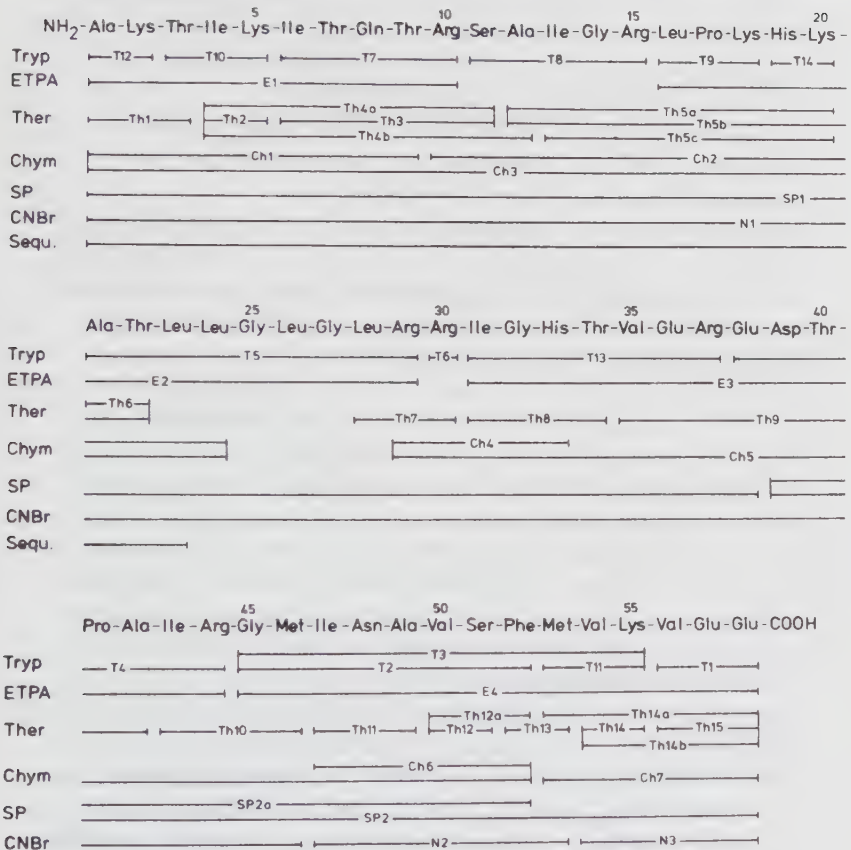


Abbildung 10: Primärstruktur des Proteins L30

Tryp = tryptische Peptide, ETPA = tryptische Peptide nach Blockierung mit ETPA, Ther = thermolytische Peptide, Chym = chymotryptische Peptide, SP = Peptide nach Spaltung mit Staphylococcus Protease, CNBr = Peptide nach Bromcyanspaltung, Sequ = durch den Sequenator ermittelte Sequenz

7) Gesamtsequenz

Die Sequenz des Proteins L30 ist in der Abbildung 10 zusammen mit allen isolierten Peptiden wiedergegeben. Auch der Bereich, in dem die Sequenzaufklärung mit dem Sequenator erfolgt war, ist eingezeichnet.

Aus dieser Abbildung kann entnommen werden, wie aus der bisher bereits dargestellten Information die gesamte Primärstruktur abgeleitet werden konnte.

Bis Position 23 hatte der Sequenator die Sequenz aufgeklärt. Alle entsprechend dieser Sequenz zu erwartenden tryptischen Peptide wurden gefunden. Durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure dieser tryptischen Peptide wurden die Sequenatorergebnisse zusätzlich bestätigt.

Von T5 sowie allen weiteren tryptischen Peptiden bis zum C-Terminus wurde die Sequenz mit dem Dansyl-Edman-verfahren bestimmt. Jede Verknüpfung von zwei tryptischen Peptiden konnte durch mehrere verschiedene Spaltungen belegt werden. So wird zum Beispiel die Lage des einzelnen Arginin in Position 30 bestätigt durch die Peptide Th7, Ch4 und SP1. Durch andere Peptide wird seine Lokalisierung zwischen zwei anderen tryptischen Peptiden ausgeschlossen. Ähnliche Überlegungen lassen sich für alle anderen Verknüpfungspunkte anstellen.

Auch die Aminosäuresequenzen innerhalb der tryptischen Peptide wurden durch die anderen Spaltungen bestätigt. Alle gefundenen Spaltstellen sind in Übereinstimmung mit der in der Literatur angegebenen Spezifität des jeweiligen Enzyms³⁶⁾. Eine Ausnahme bildet nur die mehrfach nach dem Phenylalanin in Position 52 beobachtete unspezifische Spaltung. Eine befriedigende Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, daß diese Bindung durch Säuren gespalten wurde, mit denen das Protein vor oder nach der enzymatischen Spaltung in Berührung kam. So wurde die Sephadex G100 Säule zur Proteintrennung in 15 %-iger Essigsäure betrieben, und der Auftrag auf die Peptidkarten erfolgte

üblicherweise in 30 %-iger oder 50 %-iger Ameisensäure.

Alle rein isolierten Peptide aller Spaltungen konnten in die Sequenz eingeordnet werden. Auch die Bruttoanalyse deckt sich sehr gut mit der durch diese Primärstruktur gegebenen Zusammensetzung. Damit ist in der angegebenen Sequenz alle Information widerspruchsfrei vereinigt.

8) Überlegungen zur Sekundärstruktur

Es existieren mehrere Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen auf der Grundlage der Primärstruktur³⁷⁾. Meist basieren sie auf einer statistischen Auswertung der experimentell durch die Röntgenstrukturanalysen gewonnenen Daten (z.B.³⁸⁾³⁹⁾. Oder als Grundlage dienten theoretische Überlegungen zur Stabilität einer α -Helix bzw. von β -Strukturbereichen⁴⁰⁾. Immer aber liegt der Vorhersage die Vorstellung eines globulären, rings von einer Wasserhülle umgebenen Proteins zugrunde, im einen Fall, weil fast alle Proteine bekannter Struktur in diese Kategorie gehören, im zweiten Fall, weil den Überlegungen ein solches Modell zu Grunde gelegt wurde. Ein solches globuläres Protein besteht in allen bisher bekannten Fällen aus einem dicht gepackten hydrophoben Kern, der keinen Kontakt mit Wassermolekülen hat, und aus einer hydrophilen Hülle, die mit den umgebenden Wassermolekülen in Wechselwirkung tritt⁴⁰⁾. Nur für Proteine, die diesem Strukturprinzip gehorchen, sind die Vorhersagemethoden entwickelt worden.

Ribosomale Proteine sind aber gerade dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht isoliert vorkommen, sondern in eine geordnete Überstruktur integriert sind. An der Oberfläche dieser Proteine müssen daher Bereiche liegen, die stark und spezifisch an andere Proteine oder an RNS-Moleküle binden können. Die endgültige Raumstruktur wird daher nicht nur durch intramolekulare Wechselwirkungen bestimmt

sein, sondern wird auch durch die Komplexbildung mit RNS oder anderen Proteinen beeinflusst sein.

Man hat in ähnlichen Fällen festgestellt, daß durch Assoziation die Sekundärstruktur sich stark verändern kann. So hat zum Beispiel menschliches Globin einen Anteil an α -Helix von 48 %, der bei der Bindung der Hämgruppe auf 73 % ansteigt⁴¹⁾. Ähnliches gilt für Myoglobin⁴²⁾. Auch an Ribosomen wurde gezeigt, daß durch die Bindung eines anderen Moleküls die Konformation beeinflusst wird, so durch die Bindung von Streptomycin⁴³⁾ und durch die Bindung des Initiationsfaktors IF-3⁴⁴⁾. Deshalb kann nicht erwartet werden, daß die Vorhersage der Sekundärstruktur bei einem ribosomalen Protein den wirklich im nativen Zustand, d.h. den im Ribosom vorliegenden Zustand, erfaßt, sondern es kann nur eine Aussage über die Fähigkeit bestimmter Bereiche, bestimmte Strukturen auszubilden, erwartet werden. Zu welcher endgültigen Gestalt dieses Potential dann führt, kann mit den derzeitigen Methoden noch nicht vorausgesagt werden, vor allem, weil noch nicht genügend Untersuchungen über Wechselwirkung zwischen Proteinen und über Protein-RNS-Wechselwirkung vorliegen. Da aber die Wechselwirkungen sicher nicht unabhängig sind von der Fähigkeit, eine bestimmte Sekundärstruktur auszubilden - so ist zu erwarten, daß intermolekulare Faltblattstruktur zur Assoziation zweier Proteine beitragen kann -, sind Überlegungen zur Sekundärstruktur auch im Falle der ribosomalen Proteine sinnvoll.

Die bisher am einfachsten zu handhabende Methode zur Vorhersage der Sekundärstruktur ist die von Chou und Fasman entwickelte⁴⁵⁾. Ausgehend von experimentellen Befunden der Röntgenstrukturanalysen schreiben sie jeder Aminosäure ein bestimmtes Potential zur Bildung einer α -Helix bzw. einer β -Struktur zu. Nach bestimmten Regeln können damit die Bereiche gefunden werden, für die α -helixale Struktur oder β -Struktur oder gar keine Sekundär-

struktur postuliert wird.

Wenn man auf diese Weise das Protein L30 untersucht, findet man manche Bereiche, die ein hohes Potential sowohl für α -Helix als auch für β -Struktur aufweisen. In Abbildung 11 sind daher zunächst alle Bereiche eingezeichnet, die, ohne Berücksichtigung der Alternativmöglichkeit, zur Ausbildung der jeweiligen Struktur fähig wären. Um zu unterscheiden, welche Sekundärstruktur für einen bestimmten Bereich wahrscheinlicher ist, wurden entsprechend den Vorstellungen von Chou und Fasman, daß die Ausbildung der Sekundärstruktur von einem Kernbereich hohen Potentials ausgeht, diese Kernbereiche hinsichtlich ihres Potentials für α -Helix oder β -Struktur verglichen und danach die wahrscheinlichste Anordnung postuliert. Auch diese ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die von Lim⁴⁶⁾ auf Grund theoretischer Überlegungen entwickelte Methode zur Vorhersage der Sekundärstruktur wurde ebenfalls angewandt und das Resultat in Abbildung 11 eingezeichnet. Danach sollte das Protein frei sein von Bereichen mit β -Struktur.

Leberman⁴⁷⁾ hat, basierend auf den Vorstellungen von Kotelchuck und Scheraga⁴⁸⁾, ebenfalls eine Methode entwickelt, die aber nur die Vorhersage von Bereichen mit α -helicaler Struktur erlaubt. Danach sollte der C-Terminus, wie aus Abbildung 11 ersichtlich, eine α -Helix sein.

Die in Abbildung 11 gesammelten Resultate zeigen einen erstaunlich großen Bereich, der zur Ausbildung von β -Struktur fähig ist. Das ist in Übereinstimmung mit der Untersuchung von Coher und Gratzer⁴⁹⁾, die fanden, daß in einer Mischung aller ribosomalen Proteine bei neutralem pH-Wert sich ein hoher Anteil von β -Struktur ausbildet. Damit kann keine Aussage über den nativen Zustand gemacht werden, aber es unterstreicht, daß die Fähigkeit zur Ausbildung einer Faltblattstruktur bei den ribosomalen Proteinen in ausgeprägtem Maße vorhanden ist.

Aus der Arbeit mit L30 ergaben sich mehrere indirekte Hinweise auf die Ausbildung geordneter Strukturen. So

entstand in einem Fall aus dem zunächst gut löslichen Peptid T13 (Position 31 - 37) ein auch in konzentrierter Ameisensäure nicht mehr lösbarer Niederschlag, was bei diesem kleinen Peptid nur mit einer Konformationsumwandlung in eine sehr stabile intermolekulare Faltblattstruktur erklärt werden kann. Auch das von Position 45 bis zum C-Terminus reichende Peptid E4 lag in einer löslichen und einer unlöslichen Form vor. In der Konformation eines statistischen Knäuels müßte es löslich sein. Ferner wurde bei der Elution von der Dowex-Säule eine starke Assoziation zwischen dem N-terminalen Peptid E1 und dem C-terminalen Peptid E4 beobachtet, was vielleicht darin eine Erklärung finden kann, daß beide Bereiche ein hohes Potential für β -Struktur haben.

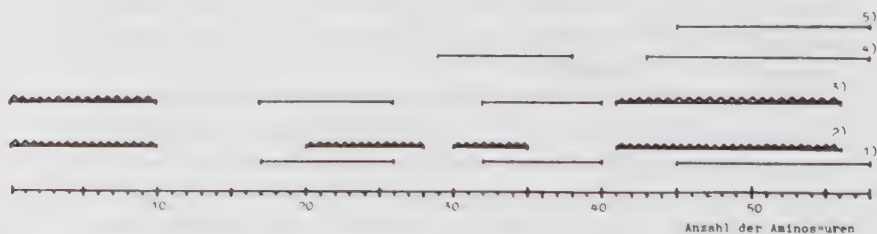


Abbildung 11: Vorhersage der Sekundärstruktur für L30

———— = α -helicaler Bereich

----- = Bereich von β -Struktur

- 1) Potential für α -Helix nach Chou und Fasman
- 2) Potential für β -Struktur nach Chou und Fasman
- 3) wahrscheinlichste Sekundärstruktur nach Chou u. Fasman
- 4) Sekundärstruktur nach Lim
- 5) Sekundärstruktur nach Leberman

IV DISKUSSION

Das Vorgehen bei der Aufklärung der Primärstruktur war in erster Linie dadurch bestimmt, daß nur kleine Mengen an Protein eingesetzt werden konnten. Dies bedeutete zunächst, daß möglichst empfindliche Nachweismethoden verwendet werden mußten. Die eingesetzten Aminosäureanalysatoren, die im Bereich von 1 bis 5 nMol arbeiteten, erfüllten diese Bedingung. Der Durrum Aminosäureanalysator erlaubt wegen der guten Konstanz der Basislinie und der automatischen Integration der Peakflächen sogar die Identifikation eines Peptids in Mengen unter 1 nMol.

Bei der Sequenzbestimmung von kleineren Peptiden ist mit der Dansyl-Edmanmethode die bisher größtmögliche Empfindlichkeit zu erreichen. Daher wurde zur Sequenzierung der Peptide nur diese Technik verwendet. Ein Nachteil dabei ist, daß damit nicht zwischen Asparaginsäure und Asparagin bzw. Glutaminsäure und Glutamin unterschieden werden kann. Durch die Bestimmung der Ladung eines Peptids mittels Elektrophorese bei pH 6,5 konnte dieses Problem meist mit geringen Substanzmengen eindeutig gelöst werden.

Die Trennmethoden für die Peptide mußten so gewählt werden, daß mit möglichst kleinen Mengen und mit möglichst kleinem Verlust gearbeitet werden konnte. Wenn Säulentechniken eingesetzt werden mußten, bedeutete das, daß möglichst kleine Säulen verwendet werden mußten. Der Übergang zu Säulen mit kleinen Dimensionen brachte daher einen großen Fortschritt. Dadurch konnte die Verdünnung des zu trennenden Materials relativ gering gehalten werden, was den Nachweis im Eluat erheblich erleichterte und die Verunreinigung durch aus dem Lösungsmittel nicht vollständig eliminierbare Stoffe verringerte.

Wenn die Peptide nur zur Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung gebraucht wurden, war eine Trennung über Säulen zu zeitraubend und benötigte zu viel Material. Denn bei sehr kleinen Substanzmengen ist ein Nachweis

im Eluat kaum mehr möglich. Deshalb wurde in diesem Fall die Peptidkartentechnik eingesetzt. Sie erlaubt die Arbeit mit sehr kleinen Mengen (10 bis 20 nMol) und hat ein hohes Auflösungsvermögen.

Nach der Sequenzierung der tryptischen Peptide waren alle Einzelelemente der Sequenz bekannt, und es mußte nur noch die Verknüpfung der einzelnen Abschnitte hergestellt werden. Dazu war es ausreichend, die Aminosäurezusammensetzung anderer Spaltprodukte zu ermitteln und die Spezifität der jeweiligen Spaltung zu berücksichtigen. Es brauchten also nur die tryptischen Peptide in größerem Maßstab isoliert zu werden. Bei den anderen Spaltungen war eine Trennung der Peptide mit Hilfe der Peptidkartentechnik ausreichend.

Das Molekulargewicht von L30 ist bei allen bisherigen Versuchen größer gemessen worden als es auf der Grundlage der nun bekannten Sequenz tatsächlich ist. Es mußte daher sichergestellt werden, daß bei der Sequenzaufklärung auch wirklich das gesamte Protein erfaßt wurde. Deshalb wurde die Spaltung mit Trypsin wiederholt und zur Trennung der Peptide andere Methoden verwendet. Bevor eine als peptidfrei angesehene Fraktion verworfen wurde, wurde durch Hydrolyse und Aminosäureanalyse sichergestellt, daß die betreffende Lösung wirklich kein Peptid enthielt. Bei beiden Trennungen wurden nur die angegebenen Peptide gefunden. Auch alle Peptidarten der tryptischen Peptide zeigten kein anderes Peptid, so daß als sicher gelten konnte, daß alle tryptischen Peptide gefunden worden waren. Dies wurde bestätigt durch die anderen Spaltungen, indem alle sauber isolierten Peptide in die Sequenz eingeordnet werden konnten. Vor allem das Auffinden der großen Bruchstücke nach der Spaltung mit der Staphylococcus Protease und mit Bromcyan bestätigte die durch die tryptischen Peptide gegebene Länge des Proteins.

Aus der angegebenen Primärstruktur läßt sich ein Molekulargewicht von 6410 Dalton errechnen. Die in den

verschiedenen Labors mit Hilfe der Gleichgewichtszentrifugation in der Ultrazentrifuge oder der Elektrophorese in Dodekylsulfat-Polyacrylamidgelen (SDS-Gelen) gemessenen Molekulargewichte schwanken zwischen 8800 und 11200 Dalton⁵⁰⁾³⁴⁾³⁵⁾. Diese Messungen erwiesen sich aber auch schon bei anderen kleinen ribosomalen Proteinen als zu groß, so zum Beispiel bei L25⁵¹⁾ oder L29⁵²⁾. Die angewandten Methoden scheinen bei solchen Proteinen nicht zuverlässig zu sein.

Untersuchungen über die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der SDS-Gel Elektrophorese⁵³⁾ haben ergeben, daß zuverlässige Werte nur bei Proteinen mit Molekulargewichten größer als 10000 Dalton zu erwarten sind. Ein zusätzlicher Störfaktor dürfte die starke Basizität der meisten ribosomalen Proteine sein. Die bei der SDS-Gel Elektrophorese zugrunde gelegte Bedingung, daß die Ladung eines Proteins nur von den gebundenen SDS-Molekülen und nicht von der Art des Proteins abhängt, dürfte daher nicht mehr erfüllt sein. Die Ladung des Proteins sowie eine mögliche Assoziation könnte auch die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Ultrazentrifuge störend beeinflussen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Primärstruktur des ribosomalen Proteins L30 aus *Eschericia coli* bestimmt.

Die Reihenfolge der ersten 23 Aminosäuren wurde mit Hilfe eines Proteinsequenators aufgeklärt. Zur Ermittlung der restlichen Sequenz wurde das Protein mit Trypsin gespalten, die Peptide über verschiedene Säulen getrennt und mit der sehr empfindlichen Dansyl-Edman-methode ihre Sequenz bestimmt. Um die Reihenfolge der tryptischen Peptide zu klären, wurden andere spezifische Spaltungen durchgeführt, die entstandenen Peptide auf Peptidkarten getrennt und ihre Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Damit war eine sich zwingend ergebende und widerspruchsfreie Anordnung der tryptischen Peptide möglich. Die Aminosäuresequenz und alle isolierten Peptide sind in Abbildung 10 dargestellt.

Auf der Grundlage der bekannten Primärstruktur wurden Überlegungen zur Sekundärstruktur angestellt.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Nomura, M., Tissières, A., Lengyel, P., (Herausgeber)
"Ribosomes", Cold Spring Harbor Laboratory 1974
- 2) Nomura, M.,
"Bacterial Ribosome", Bact. Rev. 34, 228-277. (1970)
- 3) Nierhaus, K., Dohme, F.,
"Total Reconstitution of Functionally Active 50S
Ribosomal Subunits from Eschericia coli",
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4713-4717 (1974)
- 4) Kaltschmidt, E.,
"Isoelectric Points of Ribosomal Proteins of E. coli
as Determined by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel
Electrophoresis", Anal. Biochem. 43, 25-31 (1971)
- 5) Maasen, J.A., Möller, W.,
"Identification by Photo-Affinity Labeling of the
Proteins in Eschericia coli Ribosomes Involved in
Elongation Factor G-Dependent GDP Binding",
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1277-1280 (1974)
- 6) Horne, J.R., Erdmann, V.A.,
"Isolation and Characterization of 5S RNA-Protein
Complexes from Bacillus stearothermophilus and
Eschericia coli Ribosomes"
Mol. Gen. Gen. 119, 337-344 (1972)
- 7) Gray, P.N., Garrett, R.A., Stöffler, G., Monier, R.,
"An Attempt at the Identification of the Proteins
Involved in the Incorporation of 5S RNA during 50S
Ribosomal Subunit Assembly",
Eur. J. Biochem. 28, 412-421 (1972)
- 8) Schrier, P.J., Maassen, J.A., Möller, W.,
"Involvement of 50S Ribosomal Proteins L6 and L10 in
the Ribosome Dependent GTPase Activity of Elongation
Factor G", Biochem. Biophys. Res. Com. 53, 90-98 (1973)
- 9) Highland, J.H., Ochsner, E., Gordon, J., Bodley, J.W.,
Hasenbank, R., Stöffler, G.,
"Coordinate Inhibition of Elongation Factor G Function

- and Ribosomal Subunit Association by Antibodies to Several Ribosomal Proteins",
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 627-630 (1974)
- 10) Hindennach, J., Stöffler, G., Wittmann, H.G.,
"Ribosomal Proteins, Isolation of the Proteins from 30S Ribosomal Subunits of Eschericia coli",
Eur. J. Biochem. 23, 7-11 (1971)
 - 11) Expert-Besancon, A., Guerin, M.F., Hayes, D.H.,
Legault, L., Thibault, J.,
"Preparation of E. coli Ribosomal Subunits without Loss of Biological Activity", Biochimie 56, 77-89 (1974)
 - 12) Hindennach, J., Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G.,
"Ribosomal Proteins, Isolation of Proteins from 50S Ribosomal Subunits of Eschericia coli",
Eur. J. Biochem. 23, 12-16 (1971)
 - 13) Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G.,
"Ribosomal Proteins: Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis as Applied to the Isolation of Ribosomal Proteins", Anal. Biochem. 30, 132-141 (1969)
 - 14) Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G.,
"Ribosomal Proteins. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins", Anal. Biochem. 36, 401-412 (1970)
 - 15) Liu, T.Y., Chang, Y.H.,
"Hydrolysis of Proteins with p-Toluenesulfonic Acid",
J. Biol. Chem. 246, 2842-2848 (1971)
 - 16) Hirs, C.H.W.,
"Determination of Cystine as Cysteic Acid",
in: Hirs, C.H.W. (Herausgeber), Methods in Enzymology vol. 11, S. 59-62, New York, London 1967
 - 17) Riley, M., Perham, R.N.,
"The Reversible Reaction of Protein Amino Groups with exo-cis-3,6-Endoxo- Δ^4 -tetrahydrophthalic anhydride", Biochem. J. 118, 733-739 (1970)
 - 18) Diels, O., Alder, K.,
Chem. Ber. 52, 2081 (1920)

- 19) Schäfer, D.,
"Bestimmung der Primärstruktur des ribosomalen Proteins
S6 von *Eschericia coli* durch enzymatische Spaltungen",
Dissertation Berlin 1975
- 20) Houmard, J., Drapeau, G.R.,
"A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds",
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3506-3509 (1972)
- 21) Gross, E., Witkop, B.,
"Nonenzymatic Cleavage of Peptide Bonds: The Methionine
Residues in Bovine Pancreatic Ribonuclease",
J. Biol. Chem. 237, 1856-1860 (1962)
- 22) Wittmann-Liebold, B.,
"Amino Acid Composition of the Tryptic Peptides
isolated from Proteins S4, S18 and S20 of *Eschericia
coli* Ribosomes",
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1705-1714 (1971)
- 23) Chen, R., unveröffentlicht
- 24) Edman, P.,
"Method for Determination of the Amino Acid Sequence
in Peptides", Acta Chem. Scan. 4, 283-293 (1949)
- 25) Edman, P., Begg, G.,
"A Protein Sequenator", Eur. J. Biochem. 1, 80-91 (1967)
- 26) Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S.,
Petersen, U.,
"Zur vollständigen automatischen Sequenzanalyse von
Peptiden mit Quadrol",
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1730-1732 (1971)
- 27) Laursen, R.A.,
"Solid-Phase Edman Degradation",
Eur. J. Biochem. 20, 89-102 (1971)
- 28) Hartley, B.S.,
"Strategy and Tactics in Protein Chemistry",
Biochem. J. 119, 805-816 (1970)
- 29) Ambler, R.P.,
"Carboxypeptidases A and B", in: Hirs, C.H.W. (Heraus-
geber), Methods in Enzymology vol. 11, S. 436-445,
New York, London 1967

- 30) Wittmann-Liebold, B.,
 "Amino Acid Sequence Studies on ten Ribosomal Proteins of *Escherichia coli* with an Improved Sequenator Equipped with an Automatic Conversion Device"
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1415-1431 (1973)
- 31) Bruton, C.J., Hartley, B.S.,
 "Chemical Studies on Methionyl-tRNA Synthetase from *Escherichia coli*", J. Mol. Biol. 52, 165-178 (1970)
- 32) Offord, B.D.,
 "Electrophoretic Mobilities of Peptides on Paper and their Use in the Determination of Amide Groups",
 Nature 211, 591-593 (1966)
- 33) Kaltschmidt, E., Dzionara, M., Wittmann, H.G.,
 "Ribosomal Proteins, Amino Acid Composition of Isolated Ribosomal Proteins from 30S and 50S Subunits of *Escherichia coli*",
 Mol. Gen. Gen. 109, 292-297 (1970)
- 34) Mora, G., Donner, D., Thamman, P., Lutter, L.,
 Edmund, J.H., Craven, G.R.,
 "Purification and Characterization of 50S Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*",
 Mol. Gen. Gen. 112, 229-242 (1971)
- 35) Pearson, P., Delius, H., Traut, R.R.,
 "Purification and Characterization of 50S Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*",
 Eur. J. Biochem. 27, 482-490 (1972)
- 36) Needleman, P.,
 "Protein Sequence Determination",
 Berlin, Heidelberg, New York 1975
- 37) Schulz, G.E.,
 "Comparison of Predicted and Experimentally Determined Secondary Structure of Adenyl Kinase",
 Nature 250, 140-142 (1974)
- 38) Doolittle, R.F.,
 "Logical Analysis of the Mechanism of Protein Folding, I. Predictions of Helices, Loops and β -structures from Primary Structure",
 J. Mol. Biol. 75, 401-420 (1973)

- 39) Chou, P.Y., Fasman, G.D.,
"Conformational Parameters for Amino Acids in Helical,
 β -Sheet, and Random Coil Regions Calculated from
Proteins", Biochem. 13, 211-222 (1974)
- 40) Lim, V.J.,
"Structural Principles of the Globular Organization
of Protein Chains. A Stereochemical Theory of Globu-
lar Protein Secondary Structure",
J. Mol. Biol. 88, 857-872 (1974)
- 41) Hrkal, Z., Vodrazka, Z.,
"A Study of the Conformation of Human Globin in
Solution by Optical Methods",
Biochim. Biophys. Acta 133, 527-534 (1967)
- 42) Harrison, S.C., Blout, E.R.,
"Reversible Conformational Changes of Myoglobin and
Apomyoglobin", J. Biol. Chem. 240, 299-303 (1965)
- 43) Brakier-Gingras, L., Provost, L., Dugas, H.,
"Conformational Changes Induced in Eschericia coli
Ribosomes by Streptomycin. A Spin Label Study",
Biochem. Biophys. Res. Com. 60, 1238-1244 (1974)
- 44) Gualerzi, C., Gandolfo, M., Paradies, H.P., Pon, C.,
"Circular Dichroism Analysis of the Ribosomal
Binding of Initiation Factor IF-3",
J. Mol. Biol. 92, 569-573 (1975)
- 45) Chou, P.Y., Fasman, G.D.,
"Prediction of Protein Conformation",
Biochem. 13, 222-244 (1974)
- 46) Lim, V.J.,
"Algorithms for Prediction of α -Helical and β -Struc-
tural Regions in Globular Proteins",
J. Mol. Biol. 88, 873-894 (1974)
- 47) Leberman, R.,
"Secondary Structure of Tobacco Mosaic Virus Protein",
J. Mol. Biol. 55, 23-30 (1971)
- 48) Kotelchuck, D., Scheraga, H.A.,
"The Influence of Short-Range Interactions on Protein
Conformation, 2. A Model for Predicting the α -helical

- Regions of Proteins",
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 14-21 (1969)
- 49) Cotter, R.J., Gratzer, W.B.,
"An Infrared Study of the Conformation of RNA and
Protein in the Ribosome",
Eur. J. Biochem. 8, 352-356 (1969)
- 50) Dzionara, M., Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G.,
"Ribosomal Proteins, 13. Molecular Weights of Isolated
Ribosomal Proteins of Eschericia coli",
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1909-1913 (1970)
- 51) Dovgas, N.V., Markova, L.F., Mednikova, T.A.,
Vinokurov, L.M., Alakhov, Y.B., Ovchinnikov, Y.A.,
"The Primary Structure of the 5S RNA Binding Protein
L25 from Eschericia coli Ribosomes",
FEBS Letters 53, 351-354 (1975)
- 52) Bitar, K.G.,
"The Primary Structure of the Ribosomal Protein L29
from Eschericia coli",
Biochim.Biophys. Acta 386, 99-106 (1974)
- 53) Lunker, A.K., Rueckert, R.R.,
"Observations on Molecular Weight Determinations on
Polyacrylamide Gel", J. Biol. Chem. 244, 5074-5080 (1969)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von
Prof. Dr. H.G. Wittmann und Frau Dr. B. Wittmann-
Liebold am Max-Planck-Institut für Molekulare
Genetik in Berlin-Dahlem angefertigt.

Lebenslauf

Ich wurde am 26.3.1946 in Strümpfelbach im Kreis Waiblingen in Baden-Württemberg geboren. Mein Vater, Emil Ritter, ist kaufmännischer Angestellter, meine Mutter, Maria geb. Kuppinger, ist Hausfrau.

Meine schulische Ausbildung:

1953 - 1957 Grundschule in Waiblingen

1957 - 1962 Gymnasium Waiblingen

1962 - 1964 Evangelisch-Theologisches Seminar Schöntal

1964 - 1966 Evangelisch-Theologisches Seminar Urach

Im Seminar Urach legte ich 1966 das Abitur ab.

Nach zwei Jahren Bundeswehrzeit in Oberviechtach und Regensburg begann ich 1968 an der Universität Freiburg das Studium der Chemie. 1970 legte ich die Diplom-chemiker-Vorprüfung ab, im Laufe des Jahres 1973 machte ich dann die Hauptprüfung und fertigte am Institut für makromolekulare Chemie in Freiburg die Diplomarbeit an.

Danach übersiedelte ich nach Berlin und fertigte am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik bei Prof. Dr. H.G. Wittmann die vorliegende Doktorarbeit an.

